

Université de Montréal

**Effets d'une dysbiose sur la perméabilité
intestinale et sur la taille de l'infarctus du
myocarde reperfusé chez le rat**

par

Marc-André Gagné

Département de pharmacologie et physiologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès Sciences
en Pharmacologie

Août, 2020

© Marc-André Gagné, 2020

Université de Montréal

Ce mémoire intitulé :

Effets d'une dysbiose sur la perméabilité intestinale et sur la taille de l'infarctus du
myocarde reperfusé chez le rat

Présenté par :

Marc-André Gagné

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Hélène Girouard, président-rapporteur

Guy Rousseau, directeur de recherche

Gaétan Mayer, membre du jury

Résumé

De plus en plus d'évidences suggèrent que la composition du microbiote intestinal pourrait jouer un rôle dans certaines pathologies comme l'hypertension, l'obésité, le diabète et plusieurs autres. Le but de cette étude est de démontrer que le microbiote intestinal modulé par des diètes enrichies en acide gras oméga-3 (ω -3) ou en acide gras oméga-6 (ω -6) avec un supplément ou non en probiotiques, pourrait influencer différemment la taille de l'infarctus du myocarde. Pour ce faire, des transplantations de microbiote provenant de rats nourris avec une diète ω -3 ou ω -6 combiné avec la prise ou non probiotiques ont été effectuées pendant 10 jours sur des rats dont le microbiote a été supprimé antérieurement par antibiothérapie. Ensuite, l'artère coronaire antérieure a été occluse pendant 30 minutes sur les rats transplantés et la taille de leur infarctus a été mesurée après 24 heures de reperfusion. La résistance intestinale, la concentration plasmatique de LPS (lipopolysaccharides), l'accumulation myocardique des neutrophiles, l'activation de la voie NF- κ B (nuclear factor-kappa B), l'activation de la voie de cardioprotection RISK (Reperfusion Injury Salvage Kinase) et la composition du microbiote sont les autres paramètres qui ont été mesurés. Nos résultats démontrent une taille d'infarctus plus importante chez les animaux transplantés avec le microbiote ω -6 sans probiotiques comparativement aux autres groupes incluant le groupe ayant reçu le microbiote ω -6 avec probiotiques. Ces résultats indiquent qu'un microbiote provenant d'une diète enrichie en ω -6 produit des effets délétères qui augmentent la taille de l'infarctus du myocarde comparativement à

un microbiote provenant d'une diète enrichie en ω -3 et que la prise de probiotiques permet de diminuer la taille de l'infarctus.

Mots clés : Microbiote; Infarctus du myocarde; Inflammation; Perméabilité intestinale.

Abstract

A lot of evidences suggest that the composition of the gut microbiota may play a role in certain conditions such as hypertension, obesity, diabetes and many others. The aim of our experiment is to demonstrate that the intestinal microbiota modulated by diets enriched in omega-3 fatty acid (ω -3) or in omega-6 fatty acid (ω -6) with or without a supplement in probiotics, could influence differently the size of a myocardial infarction. To do this, microbiota transplants from rats fed a ω -3 or ω -6 diet combined or not with intake of probiotics were performed for 10 days on rats whose microbiota had previously been suppressed by antibiotic therapy. Then, the anterior coronary artery was occluded for 30 minutes in the transplanted rats and the size of their infarction was measured after 24 hours of reperfusion. Intestinal resistance, plasma LPS (lipopolysaccharides) concentration, myocardial accumulation of neutrophils, activation of the NF- κ B (nuclear factor-kappa B) pathway, activation of the RISK (Reperfusion Injury Salvage Kinase) cardioprotection pathway and microbiota composition are the other parameters that were measured. Our results demonstrate a larger infarct size in animals transplanted with the ω -6 microbiota without probiotics compared to other groups (including the ω -6 microbiota with probiotics group. These results indicate that a microbiota from a diet enriched in ω -6 produces deleterious effects that increase the size of the myocardial infarction compared to a microbiota from a diet enriched in ω -3 and taking probiotics can reduce the size of the myocardial infarction.

Mots clés : Gut microbiota; Myocardial infarction; Inflammation; Gut permeability

Table des matières

Tableau des figures	6
Liste des abréviations	7
Remerciements	9
Introduction	10
Chapitre 1.	10
1.1 Microbiote intestinal.....	10
1.2 L'intestin	11
1.3 Protéines de jonction.....	12
1.4 Dysbiose et pathogenèse	13
1.5 Lipopolysaccharides (LPS).....	14
1.6 Triméthylamine-N-oxyde (TMAO).....	15
1.7 Acides gras à courte chaîne (SCFA)	16
1.8 Effets de la diète sur le microbiote	17
1.9 Diète méditerranéenne vs Diète occidentale	19
1.10 Probiotiques.....	20
Chapitre 2.	22
2.1 Infarctus du myocarde.....	22
2.2 Ischémie	22
2.3 Reperfusion.....	25
2.4 Lésions de reperfusion.....	26
2.5 Stress oxydatif.....	27
2.6 Calcium intracellulaire	27
2.7 Apoptose	28
2.8 Inflammation	30
2.9 Cardioprotection	31
Chapitre 3. Objectif et hypothèse.....	33
Chapitre 4. Matériel et méthodes	34
4.1 Modèle animal	34
4.2 Diètes.....	35
4.3 Probiotiques	36
4.4 Antibiotiques	37
4.5 Transplantation du microbiote fécal	37
4.6 Procédure chirurgicale	38
4.7 Sacrifice des rats à 15 minutes de reperfusion et récolte des organes	39
4.8 Sacrifice des rats à 24 heures de reperfusion et récolte des organes.....	39
4.9 Mesure de la taille de l'infarctus	39
4.10 Résistance intestinale	40
4.11 Concentration plasmatique de LPS	40
4.13 Mesure de l'activation de la voie RISK (phosphorylation de AKT) et de la voie NF-kappa B dans l'endocarde.....	41
4.14 Séquençage de l'ARN ribosomal (ARNr) 16S du microbiote intestinal	43
4.15 Analyses statistiques.....	44
Chapitre 5. Résultats	45
5.1 Données hémodynamiques.....	45
5.2 Taille de l'infarctus	47

5.3 Résistance intestinale	49
5.4 Concentration plasmatique de lipopolysaccharides (LPS)	51
5.5 Activité de la myéloperoxydase (neutrophiles).....	52
5.6 Activation de la voie NF-kappa B dans la région endocardique	54
5.7 Activation de la voie de cardioprotection RISK	56
5.8 Le ratio <i>Firmicutes/Bacteroidetes</i> dans le microbiote des receveurs.....	58
5.9 Comparaison du microbiote des receveurs	59
Chapitre 6. Discussion	61
Chapitre 7. Conclusion.....	66
Bibliographie.....	67

Tableau des figures

Figure 1. Activation des voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose.....	29
Figure 2. Données hémodynamiques des rats au repos avant la chirurgie.	46
Figure 3. Effets des probiotiques ajoutés à une diète sur la taille de l'infarctus du myocarde après 24 heures de reperfusion.	48
Figure 4. Effet du microbiote sur la résistance intestinale après 24 heures de reperfusion.	50
Figure 5. Effets des probiotiques sur la concentration plasmatique de LPS après 24 heures de reperfusion.....	52
Figure 6. Effets du microbiote intestinal des donneurs sur l'activité de la MPO dans la région endocardique des receveurs après 24 heures de reperfusion.	53
Figure 7. Effet du microbiote des donneurs sur l'activité du facteur nucléaire NF-κB dans la région endocardique des receveurs après 15 minutes de reperfusion.....	55
Figure 8. Effets du microbiote sur l'activité de la voie de survie cellulaire RISK dans la région endocardique après 15 minutes de reperfusion chez les receveurs.	57
Figure 9. Ratio Firmicutes/Bacteroidetes du microbiote des receveurs prélevé le jour du sacrifice.....	58
Figure 10. Comparaison de la composition du microbiote des receveurs prélevé le jour du sacrifice.....	60

Liste des abréviations

AG	Acide gras
ALA	Acide alpha-linolénique
Akt	Protéine kinase B
Akt (S)	Sérine 473 de la protéine kinase B
Akt (T)	Thréonine 308 de la protéine kinase B
APAF-1	Apoptotic peptidase activating factor 1
APS	Ammonium persulfate
ARNr	ARN ribosomal
ATP	Adénosine triphosphate
DD	Death domain
DISC	Death Inducing Signalling Complex
FADH2	Flavine adénosine dinucléotide oxydée
FasL	Fas-ligand
FC	Fréquence cardiaque
H2O2	Peroxyde d'hydrogène
HIF	Facteur inductible de l'hypoxie
HSP	Heat Shock Proteins
HTAB	Bromide d'hexadecyltrimethylammonium
HTS	Séquençage à haut débit
IFN- γ	Interféron- γ
I	Zone infarctie
IL	Interleukine
JAK	Janus kinase
JAM	Molécules d'adhésion de jonctions
LA	Acide linoléique
LPS	Lipopolysaccharides
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MI	Infarctus du myocarde
MPO	Myéloperoxydase
mPTP	Pore de transition de perméabilité mitochondriale
MyD88	Myeloid Differentiation Factor 88
NADH	Nicotinamide adénosine dinucléotide réduit
NS	Non significatif
O ₂ ⁻	Superoxyde
OH ⁻	Radical hydroxyl
OTU	Unité taxonomique opérationnelle

PA	Pression artérielle
PI3-Kinase	Phosphoinositide 3-kinase
R2	Coefficient de corrélation
R.	Receveur
R. ω -3	Receveur du microbiote provenant d'une diète ω -3 sans probiotiques
R. ω -3+P	Receveur du microbiote provenant d'une diète ω -3 avec probiotiques
R. ω -6	Receveur du microbiote provenant d'une diète ω -6 sans probiotiques
R. ω -6+P	Receveur du microbiote provenant d'une diète ω -6 avec probiotiques
RISK	Reperfusion Injury Salvage Kinase
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SAFE	Survivor Activating Factor Enhancement
SCFA	Acide gras à courte chaîne
Ser473	Sérine 473
SOD	Superoxyde dismutase
SPO2	Saturation en oxygène
STAT-3	Signal transducer and activator of transcription 3
Thr308	Thréonine 308
TLR-4	Toll-like receptor 4
TMA	Triméthylamine
TMAO	Triméthylamine-N-oxide
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
TTC	Chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium
UFC	Unité formant colonie
VG	Ventricule gauche
ZO	Zonula occludens
ZR	Zone à risque
ω -3	Oméga-3
ω -6	Oméga-6
Ω	Ohms

Remerciements

J'aimerais d'abord remercier mon directeur de recherche Guy Rousseau de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Cette expérience enrichissante en recherche m'a permis de me découvrir un merveilleux domaine. Un merci particulier pour la formation scientifique qui m'a été offerte et de m'avoir permis d'échanger et d'élargir mes connaissances scientifiques dans différents congrès et réunions scientifiques.

Un remerciement va également à Kim Gilbert, l'assistante de laboratoire qui m'a appris les différentes techniques utilisées dans mon projet de recherche. Merci pour tes conseils. Un merci particulier également à Sydnée L'Écuyer, étudiante à la maîtrise, avec qui j'ai travaillé tout le long de mon projet m'assistant au passage dans plusieurs expériences.

Je tiens également à mentionner l'aide de mes stagiaires, Fairouz Maazouz, Claude Barbeau, Geneviève Pilon et Philippe Lacroix-Ouellette qui ont grandement aidé dans l'accomplissement de ce projet. Puis, Caroline Bouchard et Louis Chiochio du service de l'animalerie du Centre de recherche de l'Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal, merci pour votre aide.

Je veux aussi mentionner l'aide financière obtenue du centre de recherche de l'Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal par la bourse J.A. de Sève et la Société Québécoise d'Hypertension Artérielle (SQHA) pour la bourse de maîtrise qu'ils m'ont accordée.

Pour terminer, merci à ma famille pour leur encouragement depuis le début de mon parcours scolaire et merci à ma copine, Audrey, pour sa patience et son support lors de ma rédaction.

Introduction

Chapitre 1.

1.1 Microbiote intestinal

Le terme «microbiote» réfère à l'ensemble des micro-organismes que ce soit des bactéries, fungi, virus ou autres qui se trouvent dans le tractus digestif humain (1). Cependant la grande majorité des espèces présentent dans ce microbiote sont des bactéries (2). Il existe dans ce microbiote un écosystème complexe d'environ 300 à 500 espèces de bactéries (3). Les bactéries qui composent le microbiote sont principalement anaérobiques (4). À la naissance, l'intestin de l'enfant est stérile et est d'abord colonisé par les bactéries provenant de la mère et de l'environnement. Le microbiote intestinal d'un nouveau-né est caractérisé par une faible diversité de bactéries avec une dominance des souches *Proteobacteria* et *Actinobacteria* ce qui changera plus tard à l'âge adulte (3). Le microbiote est plutôt stable chez un être humain adulte, mais plusieurs choses peuvent modifier sa composition, comme des infections bactériennes, des traitements aux antibiotiques, mais également le changement de diète (5). Des études sur des échantillons fécaux prélevés chez des sujets humains en santé ont démontré la présence de 8 phyla différents appartenant aux *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Cyanobacteria*, *Spirochaetes* et *Actinobacteria*. Toutefois, la très grande majorité des microorganismes retrouvés appartenaient aux phyla *Bacteroidetes* et *Firmicutes* (6).

Parmi les *Firmicutes* retrouvés dans le microbiote, plus de 95% étaient de la classe des *Clostridia*. Ce sont des bactéries Gram-positif. De plus, un grand nombre des *Firmicutes* sont des bactéries reconnues comme étant productrices de butyrate qui est un acide gras à chaîne courte (SCFA) (6).

Pour leur part, les membres du genre *Bacteroidetes* sont des bactéries Gram-négatif (7). Ces bactéries permettent principalement la production de

propionate et d'acétate qui sont également des SCFA (8). *B. thetaiotaomicron*, une bactérie du phylum *Bacteroidetes* est d'ailleurs retrouvée chez tous les individus et son implication dans des fonctions bénéfiques comme l'absorption de nutriments, ainsi que dans la maturation et le maintien des cellules épithéliales est reconnue(6).

1.2 L'intestin

On retrouve le microbiote tout au long du tractus gastro-intestinal, mais particulièrement dans l'intestin. C'est un organe très important puisqu'il permet l'absorption des nutriments et agit comme barrière physique face aux agents pathogènes (9). Les parois internes de l'intestin sont recouvertes de valvules et de villosités qui permettent d'augmenter la surface de contact en offrant jusqu'à 250 m² de superficie (10). Les cellules qui composent la muqueuse de l'intestin sont appelées entérocytes (11).

Entre ces entérocytes se trouvent des protéines de jonctions serrées qui permettent de les joindre les unes aux autres pour ainsi agir comme barrière pour empêcher le passage libre de molécules entre la lumière intestinale et les tissus sous-épithéliaux (12). La perméabilité intestinale est donc la capacité de l'intestin à contrôler le passage des molécules. Un contrôle strict signifie que la perméabilité est basse, alors qu'un passage moins contrôlé des composés signifie que la perméabilité est élevée (13). Toutefois, contrairement aux jonctions présentes dans la peau ou la vessie qui sont pratiquement imperméables et dont la perméabilité n'est pas régulée, celles présentes dans l'intestin ont une perméabilité sélective à certains ions, solutés et à l'eau qui se retrouveront éventuellement dans la circulation sanguine (12). Cependant, les protéines de jonctions bloquent le passage de macromolécules comme les lipides et les protéines. On retrouve une grande quantité de protéines distinctes dans les jonctions serrées. Parmi celles-ci se trouvent les protéines transmembranaires telles que l'occludine, les claudines et les molécules d'adhésion de jonctions (JAM) (14).

1.3 Protéines de jonction

L'occludine est une protéine à 4 domaines transmembranaires d'approximativement 65kDa qui est concentrée dans les fibrilles des jonctions serrées (15, 16). Cette molécule d'adhésion a démontré des effets sur la perméabilité aux ions et aux solutés (14). Selon certaines données, l'induction d'un stress à des rats diminue l'expression de l'occludine dans l'iléon (segment de l'intestin) menant à une perméabilité intestinale plus élevée (17). Une autre étude portant sur l'ictère obstructif en lien avec le dysfonctionnement intestinal indiquait avoir observé dans leur modèle murin, une diminution de l'expression de l'occludine qui a affecté la perméabilité de l'intestin aux endotoxines qui se retrouvaient alors en plus grande concentration dans la circulation systémique (18).

Les protéines claudines forment une famille d'au moins 24 membres et chacune d'elles a des fonctions différentes dans différents tissus. Par exemple, les claudines 2, 3, 4, 7, 12, 14 et 15 sont plutôt abondantes dans l'épithélium de 6 régions différentes l'intestin et du colon de souris (19). Parmi ces claudines, certaines agissent comme barrière aux macromolécules (claudines 3, 4, 7 et 14), tandis que les autres agissent comme pores pour le passage d'ions et d'eau (claudines 2, 12 et 15). Donc, certaines claudines diminuent la perméabilité comme dans le premier cas et d'autres, au contraire, augmentent la perméabilité, car elles laissent passer les ions comme Na^+ et Mg^{2+} (20). Selon une étude sur la maladie de Crohn, il a été remarqué que l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale était atteinte et que l'expression de protéines de jonction comme claudin-4, -5 et -8 était diminuée, tandis qu'au contraire l'expression de claudine-2 était augmentée, résultant en une augmentation de la perméabilité intestinale (21).

Les molécules d'adhésion de jonctions (JAM) sont caractérisées par 2 domaines immunoglobulines dans la partie extracellulaire, un domaine

transmembranaire et un domaine cytoplasmique avec un motif de liaison PDZ. Elles sont concentrées dans les jonctions transmembranaires des cellules endothéliales et épithéliales, mais peuvent également être exprimées sur les leucocytes et plaquettes circulantes (22, 23). Elles ont la capacité de se lier à plusieurs ligands et ont plusieurs rôles connus comme l'assemblage des jonctions serrées, la transmigration des leucocytes ou encore l'activation des plaquettes (23).

Ces protéines transmembranaires que l'on retrouve dans les jonctions serrées sont également associées à des protéines d'échafaudage pour former la structure de la jonction. En effet, le domaine intracellulaire des protéines comme les occludines, les claudines et les JAM se liera à des molécules telles que la cinguline, ou les zonula occludens (ZO) 1, 2 et 3 sur leur domaine N-terminal (24). Ces protéines d'échafaudage se lieront par leur région C-terminal au cytosquelette d'actine (25). Cela est nécessaire pour la régulation et le maintien de la jonction serrée, surtout lors de son assemblage (26).

1.4 Dysbiose et pathogenèse

Une détérioration de la barrière intestinale que forment les jonctions serrées peut mener à de l'inflammation intestinale, mais également à de l'inflammation systémique pouvant jouer un rôle important dans le développement de plusieurs maladies (27). C'est pourquoi le maintien et la protection de la barrière intestinale sont primordiaux. Des facteurs comme la nutrition et le microbiote intestinal sont également très importants pour l'intégrité de la barrière intestinale. En effet, il y a eu une augmentation importante du nombre d'études sur l'incidence de dysbiose intestinale, qui est un déséquilibre des bactéries intestinales, associé à des pathologies allant d'ulcères gastriques causés par une infection au *Helicobacter Pylori*, jusqu'à des maladies chroniques comme le diabète et l'obésité (4).

Le microbiote est défini en santé par l'équilibre entre la représentation des bactéries avec des effets bénéfiques pour la santé, dit en symbiose avec le corps,

et des bactéries potentiellement pathogènes. Un déséquilibre menant à une dysbiose, soit par une augmentation des bactéries pathogènes soit par une diminution des bactéries symbiotiques, survient lorsqu'il y a des changements de facteurs environnementaux, tels qu'une diète riche en gras et sucre, le stress, une prise d'antibiotiques ou bien une infection (28). Cela se reflète sur la santé par une baisse de l'étanchéité de la perméabilité intestinale, et une augmentation des endotoxines et des cytokines pro-inflammatoires.

Plusieurs études semblent indiquer que l'altération du microbiote intestinal serait responsable de la progression de l'obésité, du diabète et même de maladies cardiovasculaires et que 2 différentes voies pourraient être en cause. D'abord, il y aurait l'augmentation de composants bactériens dans la circulation comme les lipopolysaccharides (LPS). Ensuite, il y aurait les métabolites produits par les bactéries comme le triméthylamine-N-oxide (TMAO) ou les acides gras à chaîne courte. (29, 30).

1.5 Lipopolysaccharides (LPS)

Lorsque l'on se nourrit d'une diète riche en gras, la proportion entre les bactéries de type *Gram-négatives* est plus élevée que les bactéries de type *Gram-positives* (4). Il y a alors une grande augmentation de production et d'absorption d'endotoxines tels que les LPS, car ce sont des composants des bactéries *Gram-négatives* (31). En effet, les LPS sont dérivés des membranes cellulaires des bactéries *Gram-négatives* et sont composés de 3 domaines : d'un lipide A, d'un noyau et de polysaccharides O-spécifique(32). Par exemple, l'augmentation des *gamma-Proteobacteria*, bactéries possédant une membrane cellulaire riche en LPS, induit une inflammation suivie d'une augmentation du stress oxydatif, qui à son tour, aura un effet négatif sur la composition du microbiote en favorisant la prolifération d'autres bactéries à caractère inflammatoire (33). Dans un intestin en santé, le phylum des *Proteobacteria* prend relativement peu de place. Toutefois, lorsque leur niveau augmente, particulièrement la classe des *gamma-Proteobacteria* qui contient la famille des *Enterobacteriaceae*, le risque de

maladies augmente à cause de leur grande concentration de LPS (34). Les LPS sont appelés des endotoxines, car une fois dans la circulation sanguine, ils peuvent déclencher une réaction inflammatoire. La réponse immunitaire provoquée par les LPS, comme l'activation des monocytes et macrophages joue un rôle important dans le développement de pathologies. Les LPS peuvent activer la voie NF-kappaB qui permet la libération de cytokines (35). Des études récentes suggèrent également qu'à des concentrations physiologiques importantes, les LPS ont un effet sur la barrière intestinale en augmentant la perméabilité des jonctions serrées. En effet, ils activent des récepteurs comme le *Toll Like Receptor* -4 (TLR-4) activant la transcription de cytokines pro-inflammatoires, comme le facteur de nécrose tumoral (TNF- α), l'interféron- γ (IFN- γ) et l'interleukine-1 β (IL-1 β) qui contribuent à la diminution de la perméabilité intestinale (4, 36, 37). Le lien entre le développement de désordres métaboliques avec une faible et constante inflammation due au LPS est déjà bien établi (38).

1.6 Triméthylamine-N-oxide (TMAO)

Le TMAO est une petite molécule formée par l'oxydation de la triméthylamine (TMA) par l'enzyme hépatique *flavine-containing monooxygenases* (FMO) (39). Le TMA pour sa part est généré dans le colon par le microbiote intestinal en modifiant des amines qui proviennent de la diète comme la choline, la L-carnitine, la betaïne, la diméthylglycine et l'ergothionéine (40). Plusieurs études ont observé l'impact du TMAO sur les maladies cardiovasculaires. Il a entre autres été démontré que l'augmentation du niveau circulant de TMAO était en corrélation avec une augmentation des risques cardiovasculaires. Il aurait une influence sur la progression de l'athérosclérose en augmentant l'épaisseur de l'intima-média carotidienne (41). De plus, le TMAO permet de prédire des événements cardiovasculaires comme l'infarctus du myocarde aigu ou les récives d'accident vasculaire cérébral (AVC), car les niveaux de TMAO circulant seraient liés à l'augmentation de monocytes pro-inflammatoires (42). Même suivant un infarctus aigu, le TMAO serait un prédicteur de complications à plus long terme. Également, chez des patients ayant une défaillance cardiaque, ceux

montrant un niveau plus élevé de TMAO avaient un risque de mortalité plus élevé (43). Étant donné que le précurseur du TMA et du TMAO proviennent de facteurs comme la nutrition et du métabolisme du microbiote intestinal, ces derniers sont donc des éléments importants à considérer pour les risques cardiovasculaires.

1.7 Acides gras à courte chaîne (SCFA)

Les SCFA sont un groupe de métabolites produits par la fermentation de matière organique comme les fibres par le microbiote intestinal. Il s'agit d'acides gras qui possèdent 6 carbones ou moins. Dans ce groupe, on retrouve principalement l'acétate, le propionate et le butyrate (44). Les SCFA ainsi que leurs récepteurs sont de plus en plus sous la loupe des chercheurs comme lien majeur entre la diète/microbiote intestinal et la physiologie de l'hôte en ayant des effets à plusieurs niveaux comme les réponses endocrines, le développement de leucocytes et l'activation de facteurs de transcription (44, 45). Le butyrate, l'acétate et le propionate agissent tous comme source majeure d'énergie pour les entérocytes. De plus, comme pour les fibres alimentaires, ces molécules possèdent des propriétés anti-inflammatoires permettant de supprimer l'inflammation intestinale et ainsi provoquer des effets bénéfiques pour le cancer du côlon (46). Des études ont également démontré que les SCFA avaient des effets diminuant la pression artérielle, l'hypertrophie cardiaque ainsi que la fibrose myocardique (30, 47). Ces derniers agissent sur plusieurs récepteurs, soit le GPR41, le GPR43, le GPR109a et le OR51E2, qui selon des études, sont associés avec la régulation du métabolisme et de l'inflammation (30).

Le butyrate a des effets anti-inflammatoires sur plusieurs niveaux. Il peut limiter l'inflammation intestinale en favorisant la formation de cellules T régulatrices (Tregs), qui sont des cellules impliquées dans la réponse immunitaire acquise et qui suppriment la réponse inflammatoire (48). Le butyrate peut moduler également la fonction de cellules immunitaires innées. En effet, une étude a montré une réduction de cytokines pro-inflammatoires dans les macrophages isolés de souris

auxquelles un supplément de butyrate leur avait été donné (49). Le butyrate est aussi associé avec une diminution de l'expression de l'interleukine-8 (IL-8) et l'inhibition de l'activation de la voie NF-kappaB (50). Il permet également de réduire la perméabilité intestinale en stabilisant l'activité du facteur inductible de l'hypoxie (HIF). Le butyrate mène à l'augmentation de la consommation d'oxygène des cellules épithéliales de l'intestin, menant au phénomène d'hypoxie physiologique qui stabilise l'expression de HIF (51). Ce facteur favorise le bon fonctionnement de la barrière intestinale. Les *Ruminococcaceae*, *Eubacterium*, *Clostridia*, et *Firmicutes* ont été identifiées comme étant les principales bactéries productrices de butyrate (52).

L'acétate et le propionate ont des effets semblables. Ils ont également de multiples effets physiologiques. Ils augmentent le flux sanguin dans le colon et stimulent la motilité de l'intestin ainsi que la prolifération des cellules de crypte intestinales qui forment une invagination à la surface de la muqueuse (53). Il a été démontré que l'acétate et le propionate interagissent avec les récepteurs GPR41 et GPR43 des cellules immunitaires(54). Ils réduisent le TNF- α provenant de la stimulation par les LPS, suppriment la relâche d'interleukine-6 (IL-6) et inhibent, comme le butyrate, la voie NF-kappaB(55).

Il est donc important de porter une attention particulière aux SCFA et à leurs récepteurs pour vérifier la possibilité et l'efficacité d'une intervention sur le microbiote intestinal pour gérer l'hypertension, l'obésité et le syndrome métabolique (45).

1.8 Effets de la diète sur le microbiote

Le microbiote intestinal et ses métabolites étant très importants pour la santé de l'intestin que ce soit par des effets sur la perméabilité intestinale via les protéines de jonctions ou encore sur l'inflammation, il faut savoir ce qui permet de moduler ce microbiote. L'un des principaux facteurs est la diète. En effet, des diètes qui sont riches en gras, riches en sucre, riches en sel ou qui ont un ratio

oméga-3/oméga-6 faible ou élevé ont toutes des impacts différents sur la composition du microbiote.

Une diète à haute teneur en sucre, soit riche en glucose ou riche en fructose, augmente les niveaux d'endotoxines circulants, la masse de gras et la tolérance au glucose. Elle diminue également la diversité du microbiote. En effet, la diète riche en sucre semble diminuer la proportion de *Bacteroidetes* et augmente de façon importante la proportion de *Proteobacteria*. Cela a eu pour effet d'altérer les protéines de jonctions et augmenter la perméabilité intestinale d'environ 2,5 fois(56). Les *Proteobacteria* en faible quantité font partie d'un microbiote intestinal en santé, mais une trop grande augmentation mène à inflammation intestinale causée par leur membrane cellulaire riche en LPS (57).

Une diète riche en gras pour sa part mène plutôt à une augmentation du ratio de bactéries Gram-négatif/Gram-positif(58). Des études ont démontré une augmentation importante des bactéries du phylum *Bacteroidetes* (Gram-négatif) lors d'une consommation d'une diète riche en gras ainsi qu'en protéines animales(59, 60). Une autre étude a également démontré une baisse des *Lactobacillus*, une bactérie Gram-positif du phylum des *Firmicutes*(61). Ce type de diète induirait aussi une hyperperméabilité intestinale chez le rat en exerçant des effets néfastes sur les jonctions serrées(62). Au contraire, une diète faible en gras et riche en carbohydrate était associée avec une augmentation des *Prevotella* (59).

Une consommation riche en sel est associée à une réduction des *Lactobacillus*, ainsi qu'une réduction de la production de SCFA, particulièrement le butyrate, ce qui a pour effet d'augmenter l'inflammation intestinale (63). De plus, une diète riche en sel mène à une augmentation de la concentration plasmatique de TMAO suggérant également une altération du microbiote (64).

1.9 Diète méditerranéenne vs Diète occidentale

La diète des pays occidentaux diffère de la diète méditerranéenne principalement dans leur ratio d'oméga-6 (ω -6) par rapport aux oméga-3 (ω -3). Alors que dans la diète dite *western* on retrouve un ratio de 15-20 ω -6/1 ω -3, la diète méditerranéenne a un ratio d'environ 3 ω -6/1 ω -3 (65). Les ω -3, α -linoléique (ALA) et les ω -6, acide linoléique (LA), sont des AG polyinsaturés essentiels dans la diète, puisque le corps ne peut les synthétiser par lui-même. ω -3 ou ω -6 désigne le dernier atome de carbone de la queue lipophile qui est impliqué dans une liaison double à partir du groupement méthyl terminal de la chaîne (66). On retrouve principalement les ω -3 dans les produits de la mer comme le poisson et les fruits de mer, alors que les ω -6 sont plutôt retrouvés dans la viande animale et les huiles, comme l'huile de pépins de raisin, de noix et autres (67). La forte augmentation du nombre de cas de maladies cardiovasculaires et autres maladies reliées chez l'humain dans les pays occidentaux serait en partie reliée à cette différence dans la diète (68). De nombreuses études rapportent d'ailleurs les bienfaits des ω -3 dans la diète, particulièrement sur le système cardiovasculaire, le système cérébral, le système endocrinien et l'inflammation (68-71). Il a d'ailleurs été démontré que les ω -3 permettent de réduire la taille des infarctus suite à une ischémie et amenaient une diminution de l'apoptose post-reperfusion observée dans l'amygdale et l'hippocampe un effet qui était masqué par les ω -6 dans un modèle murin (72). Toutefois, les études cliniques ne font pas consensus sur les effets bénéfiques des ω -3 et bien qu'une étude récente suggère des effets bénéfiques (73), plusieurs autres ne les ont pas observés. D'autres études sont nécessaires afin d'établir le bienfait ou non des ω -3 dans les maladies cardiovasculaires(74, 75).

Il a été montré qu'une diète enrichie en acide gras oméga-3 (ω -3) menait à une prolifération du phylum *Firmicutes* et une réduction du nombre de bactéries provenant du phylum *Bacteroidetes* et inversement avec une diète enrichie en acide gras oméga-6 (ω -6) en aussi peu que 14 jours chez l'humain(69). De plus, des bactéries de genres *Eubacterium*, *Roseburia*, *Anaerostipes*, *Coprococcus*, *Subdoligranulum* et *Pseudobutyrvibrio* ont proliféré de manière

importante avec une diète enrichie en ω -3 (69). Ces bactéries sont associées à la production de butyrate. Le butyrate, comme mentionné précédemment, joue un rôle clé dans le maintien de la santé de l'intestin, puisqu'il constitue une source majeure d'énergie pour la muqueuse colique et a une grande importance dans la régulation de l'expression de gènes, de l'inflammation et de l'apoptose dans les cellules (69). Cela suggère donc qu'une diète riche en ω -3 serait bénéfique pour la santé et qu'elle permet de rétablir l'équilibre du microbiote (76).

1.10 Probiotiques

La diète n'est pas le seul facteur pouvant moduler le microbiote intestinal. La prise de probiotiques est également une méthode efficace pour y arriver. Les probiotiques sont, selon l'Organisation mondiale de la santé, des « organismes vivants qui procurent un bénéfice à son hôte lorsqu'ils sont en quantité suffisante » (77).

Les bactéries du genre *Bifidobacterium*, provenant du phylum des *Actinobacteria* sont les bactéries les plus largement utilisées avec les *Lactobacillus* du phylum des *Firmicutes*. Les mécanismes d'action, ainsi que l'efficacité varient beaucoup entre les différentes espèces du même genre, ce qui rend difficile la sélection d'une seule espèce (78). Toutefois, les caractéristiques des *Bifidobacterium supp.* et les *Lactobacillus* sont largement documentés et démontrent des effets intéressants. Des études démontrent que les probiotiques *Bifidobacterium supp.* peuvent aider à maintenir l'homéostasie de la glycémie, réduire le gain de poids et restaurer la sécrétion d'insuline modulée par le glucose dans des souris soumises à une diète riche en gras (79). Ils ont également des effets sur les voies de signalisation de l'inflammation. En effet, ils sont liés à la production de SCFA. Les SCFA interagissent avec les récepteurs couplés aux protéines G (GPR41 et GPR43) dans les cellules immunitaires du côlon humain et permettent l'expression de chémokines dans l'épithélium du côlon. Les SCFA inhibent également NF- κ B et affectent ainsi la production de cytokines pro-inflammatoires (36). Dans une autre étude, une formule probiotique VSL#3, composée de *S. thermophilus*, d'espèces de *Lactobacillus* et d'espèces de

Bifidobacterium, a été donnée à des souris souffrantes d'une colite induite par du sulfate de dextran sodique. Il a été démontré que les souris traitées au VSL#3 présentaient une perméabilité intestinale réduite en comparaison à celle observée chez les souris non-traitées au VSL#3 ainsi qu'une réduction de l'inflammation. L'expression et la localisation des protéines de jonctions serrées, soit l'occludine, les claudines et les ZO étaient aussi rétablies (80). Ces probiotiques ont donc prouvé leur rôle sur la perméabilité intestinale en ayant un effet sur les protéines de jonction et dans la diminution de l'inflammation.

Les *Akkermansia muciniphila* sont également reconnus pour leurs effets positifs sur la santé. Ces bactéries *Gram-négatif* sont de bons producteurs d'acétate et de propionate, mais également favorisent la prolifération d'autres bactéries qui elles produiront du butyrate (50). Plusieurs études ont montré que le nombre de cette espèce de bactéries était diminué dans le cas de nombreuses pathologies comme l'obésité, le diabète, les désordres métaboliques et autres. Les *Akkermansia muciniphila* augmenteraient le nombre de cellules anti-inflammatoires Treg et diminueraient l'inflammation endotoxique en restaurant l'intégrité de la barrière intestinale (81).

Chapitre 2.

2.1 Infarctus du myocarde

Au Canada, il y a près de 2,4 millions d'adultes qui vivent avec une cardiopathie ischémique (82). La cardiopathie ischémique est définie comme étant l'ensemble des problèmes cardiaques causés par le rétrécissement ou l'obstruction des artères qui approvisionnent le cœur, soit les artères coronaires (83). Le rétrécissement de l'artère peut être provoqué par la constriction du vaisseau sanguin, par la formation d'un caillot ou par des plaques d'athérome dont l'accumulation est appelée athérosclérose (84). Lorsqu'il y a obstruction complète de la circulation sanguine vers le muscle cardiaque, il se produit alors une ischémie menant à un infarctus du myocarde (MI), phénomène pour lequel près de 600 000 adultes canadiens présentent un antécédent (82). L'arrêt du flux sanguin entraîne donc une baisse importante de l'apport en oxygène (hypoxie) et de nutriments causant un déséquilibre entre les besoins métaboliques des cellules et la production d'adénosine triphosphate (ATP), source principale d'énergie dans la cellule, ce qui mène à des lésions et à la mort des cardiomyocytes (85, 86). Les perturbations du rythme cardiaque causées par un infarctus peuvent même mener à une insuffisance cardiaque, voire à l'arrêt cardiaque et la mort (87). Lorsqu'une occlusion de ce genre se produit, elle peut être débloquée grâce à l'injection d'agents thrombolytiques, l'angioplastie ou à l'aide d'un pontage coronarien (88).

2.2 Ischémie

L'ischémie myocardique se produit lorsque la circulation sanguine ne peut amener suffisamment d'oxygène pour combler la demande des cellules cardiaques afin qu'elles maintiennent leurs fonctions. En effet, l'oxygène normalement fourni aux cellules cardiaques a pour principale utilité de produire des molécules d'ATP essentielles au métabolisme aérobie et à la survie cellulaire par l'oxydation des acides gras (AG) (89).

La β -oxydation transforme, par plusieurs réactions enzymatiques, les acides gras en molécules de nicotinamide adénosine dinucléotide réduit (NADH) et de flavine adénosine dinucléotide réduit (FADH_2), qui pourront par la suite être converties en ATP par la phosphorylation oxydative (90). D'autre part, la β -oxydation permet la production d'acétyl-CoA qui sera oxydé dans le cycle de Krebs (91). Ces processus impliquant les acides gras ne peuvent se produire lorsqu'un tissu manque d'oxygène et représentent à eux seuls 60 à 80% de l'énergie nécessaire à la contraction du cœur en condition aérobie (92). Le reste des 20 à 40% de l'énergie est desservi par la glycolyse aérobie à partir du glucose qui permet également de produire des molécules impliquées dans le cycle de Krebs via la production de pyruvate (92, 93).

Lorsqu'il y a ischémie, il y a moins d'oxygène de disponible. Les cellules passent donc d'un métabolisme aérobie en un métabolisme anaérobie. La contraction des cardiomyocytes est altérée et le potentiel membranaire diminue (94). En l'absence d'oxygène, la glycolyse anaérobie devient la principale source d'ATP (de 80-90% de l'énergie fournie). Cependant, le rendement énergétique de cette dernière est beaucoup plus faible que celui de la voie oxydative (93). En effet, 2 molécules d'ATP seulement sont produites avec une molécule de glucose, contrairement à 36 molécules d'ATP lorsque la voie oxydative est utilisée, ce qui est 18 fois moins efficace (93). La glycolyse anaérobie produit du pyruvate et du lactate. Le pyruvate, normalement utilisé dans le cycle de Krebs en condition aérobie, sera plutôt transformé aussi en lactate par la lactate déshydrogénase (95). La source de protons provenant de la production de lactate mène également au développement de l'acidose intracellulaire. Cette acidose aura d'ailleurs de multiples effets néfastes, comme l'augmentation de la concentration de Ca^{2+} (via les échangeurs Na^+/H^+ et $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$), l'augmentation de radicaux libres et l'altération de protéines structurales et du fonctionnement de nombreuses enzymes (93).

Une cellule utilisant la glycolyse anaérobie épuise rapidement ses réserves de phosphocréatine (environ 3 minutes), une source de production rapide d'ATP et de son glycogène (91, 96). L'énergie produite devenant insuffisante, elle ne parvient pas à alimenter les pompes membranaires qui maintiennent le gradient ionique.

Après seulement 15 minutes d'ischémie, les niveaux d'ATP diminuent à près de 35% de la quantité normale. Jusqu'à environ 15 à 20 minutes d'ischémie, les dommages sont considérés comme réversibles, car le retour du flux sanguin permettrait aux cellules de retrouver une fonction normale (96) après un délai plus ou moins long.

Dans des modèles animaux et humains, les dommages irréversibles aux cardiomyocytes sont observables après 20 minutes d'ischémie, entre autres par la nécrose de coagulation des cardiomyocytes qui ne sont plus perfusés (97). Plusieurs étapes mènent à cette mort cellulaire. Il y a l'augmentation de la concentration de Na^+ dû à l'arrêt de la pompe Na^+/K^+ dépendante de l'ATP qui provoque l'activation de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ menant à une trop grande entrée de calcium. L'augmentation de la concentration de calcium est une des causes principales des dysfonctions lors de l'ischémie-reperfusion (93). Il a également été observé par microscopie électronique que des cellules myocardiques en ischémie pendant 30 à 60 minutes subissent de nombreuses modifications comme la diminution du glycogène, l'œdème mitochondrial et l'aggrégation de la chromatine (98). La mort cellulaire sera visible d'abord dans la région sous-endocardique et progressera vers la région sous-épicaire. En effet, les vaisseaux sanguins endocardiques éjectent plus de sang lors de la systole que les vaisseaux épicaïques et il ne reste que peu de sang pour la perfusion diastolique. À la moindre baisse du flux sanguin, les tissus endocardiques deviennent plus à risque de dommages ischémiques (89).

Plus tard, des mastocytes et l'infiltration de fibroblastes mèneront au développement de fibrose dans le cœur. Les fibroblastes se différencient en

myofibrilles et sécrètent du collagène en abondance causant la fibrose et un dysfonctionnement cardiaque (97).

La durée de l'ischémie est donc évidemment un facteur très important dans la sévérité de l'infarctus du myocarde. Il y a une relation directement proportionnelle entre le temps de l'ischémie et la taille de la zone infarctée pour les 3 premières heures suite à quoi un plateau est atteint dans certains modèles comme le chien. Donc plus l'ischémie est maintenue longtemps, plus grand sera l'infarctus (99). Toutefois, plusieurs autres facteurs sont également critiques comme la grandeur de la zone à risque (ZR) qui correspond à la zone perfusée par l'artère occluse. Ainsi, si l'occlusion empêche le sang de circuler dans une plus grande région, les dommages s'étendront davantage. L'occlusion partielle ou complète de l'artère est aussi à prendre en compte ainsi que la présence d'anastomoses qui pourraient amener un peu d'oxygène aux cellules qui normalement ne pourraient pas y avoir accès. Il y a également le travail cardiaque, soit la demande métabolique. Plus la demande en énergie est grande, plus les dommages se feront rapidement (100).

2.3 Reperfusion

Le seul moyen de combattre les effets de l'ischémie et d'éviter un maximum de dommages au myocarde, c'est de permettre la reperfusion du tissu de la zone ischémique. En effet, pour rétablir le fonctionnement des cellules encore atteintes de façon réversible et ainsi diminuer la taille de l'infarctus, le retour du flux sanguin est essentiel (101). Pour ce faire, on peut débloquent l'occlusion coronarienne par injection d'agents thrombolytiques, par angioplastie ou l'aide d'un pontage aortocoronarien (88). Toutefois, cette reperfusion a un effet à double tranchant. En plus du rétablissement de l'oxygène, le retour du flux sanguin permet d'évacuer les déchets métaboliques, d'équilibrer les concentrations d'électrolytes, ainsi que le pH. Toutefois, la reperfusion peut entraîner des lésions appelées lésions de reperfusion. Le rétablissement de la circulation peut léser les cellules myocardiques et mener à la mort de ces dernières qui n'avaient pas encore touché

de manière irréversible. Il faut donc tenter de contrôler les lésions de reperfusion pour diminuer les dommages irréversibles (102).

2.4 Lésions de reperfusion

Il a été démontré que plusieurs phénomènes présents durant la reperfusion étaient à l'origine de la mort des cardiomyocytes qui étaient encore viables avant cette dernière. Effectivement, ces lésions de reperfusion seraient responsables de près de 50% de la taille de l'infarctus (101). À la suite d'une ischémie chez le chien, plusieurs changements ont été observés au niveau des cardiomyocytes reperfusés, comme un gonflement cellulaire, une contraction soutenue des myofibrilles, une rupture du sarcolemme, la perte de mitochondries, la libération d'enzymes cytoplasmiques et la nécrose en bande de contraction (103). La nécrose en bande de contraction est causée par une hypercontraction des myofibrilles du myocarde et par les dommages aux mitochondries engendrés par la période d'ischémie. Comme les processus de nécrose en général, la nécrose en bande de contraction se traduit par l'éclatement de la cellule, répandant le contenu cellulaire dans l'espace interstitiel. La nécrose conduit à une réponse inflammatoire importante afin d'éliminer les débris cellulaires libérés par les cellules nécrotiques (104).

Plusieurs phénomènes peuvent être la cause de ces lésions de reperfusion. En effet, la reperfusion cause une forte augmentation de radicaux libres sous forme d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui peuvent être très nocifs pour le tissu cardiaque (105). Il y a également une forte augmentation de Ca^{2+} intracellulaire lors de la reperfusion. Les cellules cardiaques sont alors à risque de rupture puisque le Ca^{2+} soutient une contraction continue des myofibrilles (106). La présence à la fois de ROS et de Ca^{2+} dans le myocyte peut activer l'ouverture non spécifique des pores de la membrane de la mitochondrie (mPTP). Cette ouverture inhibe la chaîne respiratoire, essentielle pour la production d'ATP (107). Une ouverture prolongée peut induire le processus d'apoptose (108).

2.5 Stress oxydatif

La reperfusion génère du stress oxydatif. Effectivement, on observe une augmentation importante de radicaux libres sous forme de ROS dont l'anion superoxyde (O_2^-), le radical hydroxyl (OH^-) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (109). Ce qui augmente encore davantage le stress oxydatif est la diminution de l'expression d'enzymes antioxydantes comme la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase suite à une période d'ischémie (110). Donc, le stress oxydatif généré par une augmentation des radicaux libres lors de la reperfusion conduit entre autres à la peroxydation lipidique et aux bris des membranes (111). Donc, le stress oxydatif généré par une augmentation des radicaux libres et une diminution de l'activité antioxydante semblerait jouer un rôle dans la mort des cardiomyocytes en causant entre autres le bris des membranes.

2.6 Calcium intracellulaire

Afin de restaurer le pH durant la période de reperfusion, il y a activation de l'échangeur sodium-hydrogène afin d'éliminer les ions hydrogène et de l'échangeur sodium-calcium pour rétablir les concentrations de sodium, ce qui génère une augmentation de la concentration de calcium dans la cellule (112). Donc, en plus du stress oxydatif, il y a une augmentation intracellulaire importante de Ca^{2+} (101). La contraction des cardiomyocytes est alors soutenue, ce qui peut causer la mort de ceux-ci par nécrose en bandes de contraction (113). De plus, durant les premières minutes de reperfusion, il y a l'ouverture des mPTP localisés dans la membrane interne à cause de l'augmentation de Ca^{2+} dans les mitochondries et la synthèse de ROS, ce qui interrompt la chaîne respiratoire et induit l'affaiblissement de la membrane mitochondriale (114). L'ouverture prolongée des mPTP peut induire le processus d'apoptose (108).

2.7 Apoptose

L'apoptose ou mort cellulaire programmée sert à maintenir l'homéostasie des tissus en dégradant les cellules endommagées. L'apoptose diffère de la nécrose, en raison de son processus d'enclenchement et de la façon dont la cellule meurt, soit par corps apoptotiques, ce qui ne causent pas d'inflammation (115). Il existe 2 différentes voies physiologiques menant à l'apoptose, soit la voie intrinsèque et la voie extrinsèque (116).

La voie intrinsèque est activée par un haut niveau de stress comme l'hypoxie ou le stress oxydatif. La famille des protéines BCL-2, la *Apoptotic peptidase activating factor 1* (APAF-1) ainsi que la caspase-9 régulent cette voie. Dans la famille des protéines Bcl-2, on retrouve des protéines pro-apoptotiques telles que Bax et Bak, ainsi que des protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2 et Bcl-XL. L'ouverture du mPTP libère le cytochrome c. Cette ouverture dépend de l'interaction des molécules de la famille Bcl-2, qui sont soit anti-apoptotique ou pro-apoptotique (116). Lorsqu'il est libéré, le cytochrome c se fixe sur APAF-1 qui se lie ensuite à la pro-caspase-9, formant l'apoptosome. Une fois activée, la caspase-9, une caspase initiateur, active la caspase-3, la caspase effectrice (117, 118).

La voie extrinsèque de l'apoptose nécessite un signal extérieur à la cellule (ex. : Fas-ligand (FasL), TNF- α) qui se fixe à son récepteur (116). Leur liaison conduira à la trimérisation de leur récepteur membranaire, puis au recrutement de protéines adaptatrices dont TRADD et FADD via le death domain (DD) des récepteurs. Cette interaction permet la formation du *Death Inducing Signalling Complex* (DISC), un complexe pro-apoptotique, formé lorsque les initiateurs apoptotiques, les pro-caspase 8 et pro-caspase-3, sont recrutés. DISC permet l'activation de la caspase-8. La caspase-8 active ensuite la caspase-3 et enclenche l'apoptose de la cellule. Tout comme la voie intrinsèque, la caspase-3 se charge entre autres de condenser le matériel nucléaire, dégrader l'ADN et décomposer la cellule en fragments, appelés corps apoptotiques (116, 119-121).

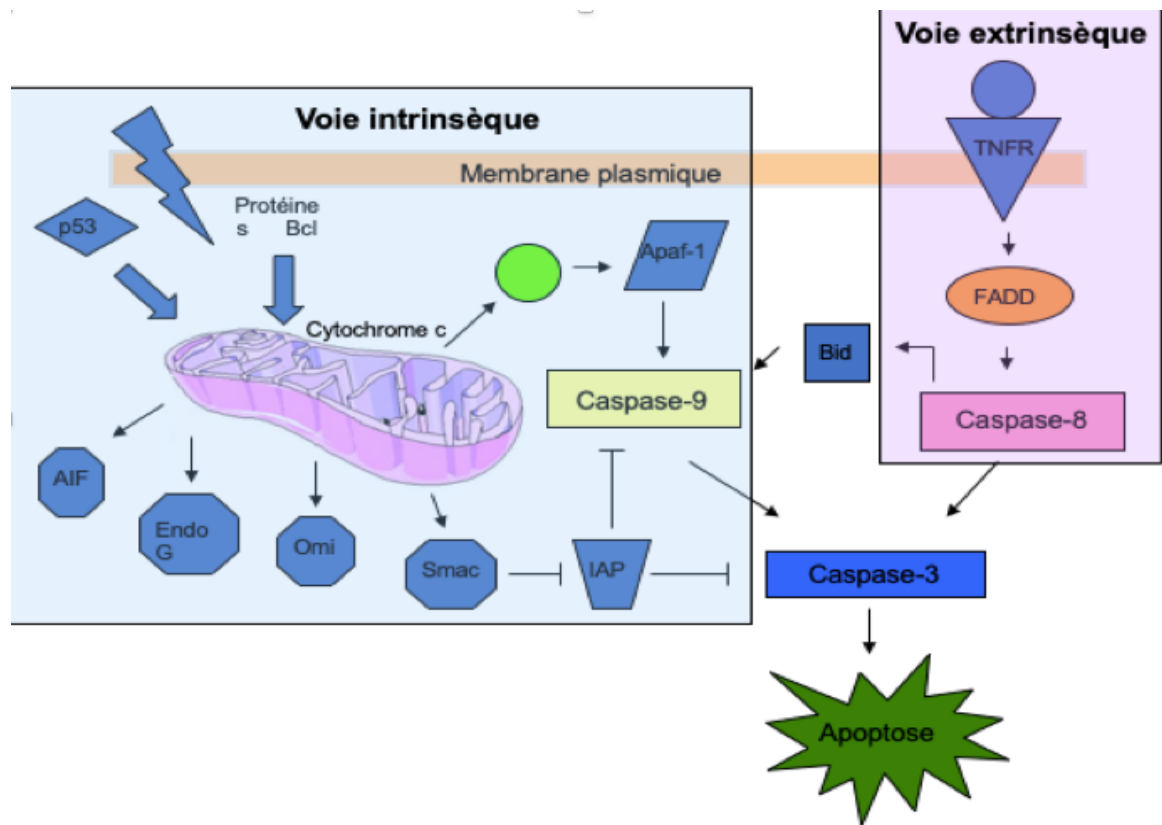


Figure 1. Activation des voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose.

L'apoptose s'observe presque uniquement en période de reperfusion, ce qui suggère qu'elle a un rôle important dans les lésions de reperfusion (122). Il a aussi déjà été démontré qu'une inhibition de l'apoptose via des procédés pharmacologiques réduit la mort cellulaire et la taille de l'infarctus (123) (124). Aussi, la surexpression de Bcl-2, une molécule anti-apoptotique, dans un modèle expérimental d'ischémie-reperfusion s'est avérée efficace afin de contrer les effets des lésions de reperfusion ce qui confirme que l'apoptose est importante dans la détermination de la taille d'un infarctus (125) (126).

2.8 Inflammation

Il a également été établi que la reperfusion est associée à une augmentation de l'inflammation dans le myocarde ce qui contribue aux lésions de reperfusion.

Les *Heat Shock Proteins* (HSP) et la fibronectine par exemple sont des déchets cellulaires provenant des myocytes nécrosés pouvant activer des récepteurs TLR, comme le TLR-4 qui est le plus présent dans le coeur, activant ainsi le système immunitaire. Il joue un rôle critique dans l'inflammation du myocarde, particulièrement lors d'un infarctus ou de la reperfusion (127). L'activation de ces récepteurs induit la production de cytokines pro-inflammatoires, comme IL-1 β , IL-6, IL-8 et TNF- α (128). IL-8 permet d'attirer des cellules immunitaires dans la zone d'inflammation. La voie d'activation impliquée est la voie TLR4/MyD88/NF- κ B. TLR4 active le *Myeloid Differentiation Factor 88* (MyD88), ce qui enclenche une série d'association et d'activation qui aboutissent à la phosphorylation de I κ B, l'inhibiteur de NF- κ B, et la libération du facteur nucléaire NF- κ B, qui transloque au noyau, s'active et régule l'expression d'un grand nombre de cytokines pro-inflammatoires (127). Plusieurs études ont d'ailleurs démontré que les niveaux de TLR4 et de NF- κ B étaient significativement élevés dans les zones infarctées et les zones à risque, et que l'apoptose des myocytes était fortement induite au début de la période de reperfusion (129, 130).

Les débris cellulaires peuvent aussi activer le système du complément, ce qui mène à la lyse des cellules ciblées. La relâche de constituants membranaires lors de l'ischémie et de la période de reperfusion active le système du complément par la voie classique (131). Les débris cellulaires lient le C1q pour ensuite activer C1, puis C4, C2 et C3. Finalement, les effecteurs C5 à C9 seront à leur tour activés et permettront le recrutement de cellules inflammatoires, essentiellement les neutrophiles (132). Les cytokines et le système du complément sont des substances chimioattractantes, ce qui attire les cellules immunitaires vers le site d'inflammation (108). Dès les premières minutes de reperfusion, la présence de neutrophiles augmente fortement. La myéloperoxydase (MPO) est retrouvée dans

les granules des neutrophiles. C'est pourquoi le dosage de la MPO permet de mesurer la présence et l'activité des neutrophiles dans un tissu (133). La reperfusion myocardique induit une importante accumulation de neutrophiles dans la zone ischémique, représentant entre deux et six fois celui que l'on retrouve dans le myocarde lorsqu'il n'y a pas eu d'ischémie (134). La libération d'enzymes protéolytiques et de ROS par les neutrophiles peut infliger des dommages supplémentaires au tissu myocardique. D'ailleurs, il a déjà été démontré qu'une délétion en neutrophiles induit une diminution de la taille de l'infarctus (135, 136).

Bien que l'inflammation ne semble pas très bénéfique à première vue, elle est tout de même essentielle pour permettre la guérison du tissu et permettre sa cicatrisation. Les myocytes expriment une variété de molécules qui contribuent à l'infiltration de neutrophiles pour aider au processus de réparation des tissus (127, 137). Toutefois, cette réponse inflammatoire doit être transitoire et se résoudre, sans quoi une activation soutenue sera à l'origine des lésions de reperfusion, ce qui contribuerait à une augmentation de la taille de l'infarctus (138).

2.9 Cardioprotection

L'activation de 2 voies de cardioprotection permet de prévenir les lésions de reperfusion : *Reperfusion Injury Salvage Kinase* (RISK) et *Survivor Activating Factor Enhancement* (SAFE) (139). En effet, les myocytes possèdent ces voies de protection qui encouragent la survie cellulaire et entrent en jeu lorsque les myocytes sont soumis au stress d'un infarctus.

La voie RISK implique la protéine kinase B (Akt) ainsi que Erk1/2, un membre des *mitogen-activated protein kinase* (MAPK). Akt possède deux sites de phosphorylation nécessaires à son activation : la thréonine 308 (Thr308) et la sérine 473 (Ser473). La phosphorylation de Thr308 ne permet qu'une activation partielle d'Akt ; la phosphorylation des deux sites est nécessaire pour l'activation complète. Pour que Akt puisse être activé, il peut être recruté à la membrane par la phosphoinositide 3-kinase (PI3-Kinase) ou être activé par des signaux externes

comme des HSP. Akt cible des protéines impliquées dans le processus d'apoptose. Par exemple, lorsque BAD est phosphorylé par Akt, il perd son potentiel pro-apoptotique. Akt peut également phosphoryler la pro-caspase-9 pour l'inhiber, l'empêchant ainsi d'aller activer la pro-caspase-3 et inhiber ainsi le processus d'apoptose. Akt peut aussi réguler l'activité de I κ B. Alors NF- κ B transloque vers le noyau et permet la transcription de gènes anti-apoptotiques comme Bcl-xL et des inhibiteurs de caspases (140). Finalement, Akt peut inhiber l'ouverture du mPTP en phosphorylant eNOS, ce qui accroît la production du monoxyde d'azote, qui joue sur l'ouverture du mPTP (141).

La voie SAFE est pour sa part déclenchée entre autres par TNF α qui une fois liée à son récepteur membranaire, initie l'activation des Janus kinase (JAK) et des *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT-3). Ces protéines agissent également sur la perméabilité membranaire mitochondriale et ont pour effet la réduction de la mort cellulaire (139).

Chapitre 3. Objectif et hypothèse

Le but de notre étude était de démontrer que le microbiote intestinal, modifié par des diètes enrichies en ω -3 ou en ω -6 et par la prise de probiotiques, pouvait avoir un effet sur la taille de l'infarctus. Pour ce faire, des transplantations de microbiote provenant de rats avec une diète ω -3 ou ω -6 avec ou sans probiotiques ont été effectuées sur des rats dont le microbiote a été supprimé antérieurement. Une occlusion d'une artère coronaire a été faite sur les rats qui ont reçu les transplantations de microbiote. La taille de leur infarctus a été mesurée, tout comme la perméabilité intestinale, la composition du microbiote, l'inflammation et la voie de cardioprotection RISK. L'hypothèse de départ était que la dysbiose que provoquerait une diète ω -6 sur le microbiote aurait un effet néfaste sur le cœur des receveurs et que la présence de probiotiques comportant des propriétés anti-inflammatoires atténuerait les effets néfastes du microbiote provenant de la diète ω -6.

Chapitre 4. Matériel et méthodes

4.1 Modèle animal

Les animaux ont été hébergés en suivant les lignes directrices du Conseil canadien de protection des animaux (CCPA). Les expérimentations sur les animaux ont été approuvées par le comité d'éthique animale de l'Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal. Dans cette étude, 112 rats mâles albinos Sprague-Dawley adultes (environ 300 g) (Charles River Canada, St-Constant, QC, Canada), ont été logés dans des cages individuelles à 22°C avec humidité relative de 40-50% et soumis à un cycle d'éveil/sommeil de 12h, à partir de 8h00. Les rats ont eu 3 jours d'acclimatation à leur milieu sans diète spécifique. Les rats ont ensuite été séparés aléatoirement en deux groupes : 36 rats donneurs et 76 rats receveurs.

Parmi le groupe donneur, les rats sont divisés en 4 sous-groupes (9 rats par sous-groupe) et pendant un minimum de 21 jours avant le prélèvement de leurs fèces pour les transplantations fécales et tout le long du reste du protocole, ils ont reçu environ 30 g/jour d'une diète enrichie en ω -3 (ratio ω -6/ ω -3 = 1:1) ou enrichie en ω -6 (ratio ω -6/ ω -3 = 20:1) (voir tableau 1.) combinée ou non avec des probiotiques (détails dans section probiotiques) dissous dans l'eau (*Bifidobacterium longum* R0175 et *Lactobacillus helveticus* R0052).

En parallèle, le groupe receveur était nourri *ad libitum* avec une diète standard (Charles River). Les receveurs ont reçu pendant 15 jours un mélange d'antibiotiques dans leur eau afin de supprimer leur microbiote intestinal (détails dans la section « Antibiotiques »).

Une transplantation du microbiote intestinal du groupe donneur au groupe receveur est effectuée 3 jours après la fin du traitement aux antibiotiques, et ce pendant 10 jours consécutifs. Le groupe receveur (R.) est alors divisé en sous-groupes correspondants aux sous-groupes du groupe donneur : un groupe reçoit

le microbiote provenant d'une diète enrichie en ω -3 sans probiotiques (R. ω -3), un groupe reçoit le microbiote provenant d'une diète enrichie en ω -3 avec probiotiques (R. ω -3+P), un groupe reçoit le microbiote provenant d'une diète enrichie en ω -6 sans probiotiques (R. ω -6) et un groupe reçoit le microbiote provenant d'une diète enrichie en ω -6 avec probiotiques (R. ω -6+P). Chaque sous-groupe receveur comprend 19 rats. Après 10 jours de transplantation, les rats receveurs ont subi une chirurgie cardiaque où l'artère descendante antérieure gauche est occluse pendant 30 minutes. Parmi les 76 rats receveurs, 32 rats (8 rats de chaque sous-groupe) ont été sacrifiés après 15 minutes de reperfusion et permettent d'évaluer les voies de signalisation de cardioprotection. Les 44 rats (11 rats par sous-groupe) sacrifiés après 24h de reperfusion permettent d'évaluer la perméabilité intestinale, la taille de l'infarctus, l'accumulation endocardique des neutrophiles ainsi que la concentration plasmatique de LPS. Le nombre de rats par groupe n'inclut pas les rats morts lors de la chirurgie, soit 1 dans chacun des groupes R. ω -3. et R. ω -6, ainsi que 2 dans le groupe R. ω -3+P et 3 dans le groupe R. ω -6+P.

4.2 Diètes

Les donneurs reçoivent une diète spécifique riche en lipides (22% de protéines, 42.9% de carbohydrates, 20.3% de gras) avec des ratios ω -6/ ω -3 différents provenant de Envigo Teklab (Madison, Wisconsin, USA). Les sous-groupes de donneurs ω -3 et ω -3+P ont un ratio 1:1 et les sous-groupes ω -6 et ω -6+P un ratio de 20:1. Le détail de la composition des diètes enrichies en gras est présenté dans le tableau 1. Pour leur part, tous les receveurs reçoivent une diète standard (Charles River).

Tableau 1. Composition des gras (g/kg) des diètes enrichies en Omega-3 (1 : 1) et Omega-6 (20 : 1).

	Composition des diètes	
	Diète Omega-3	Diète Omega-6
Gras total	202.5	202.5
Gras saturés	78.1	71.3
Acide myristique	12.8	8.0
Acide palmitique	21.5	21.8
Acide margarique	0.5	0
Acide stéarique	11.2	10.0
Gras mono-saturés	33.7	39.7
Gras poly-saturés	83.2	88.2
Oméga-6 PUFA		
18:2 w-6 (LA)	38.9	0
20:4 w-6 (AA)	1.3	84.0
Oméga-3 PUFA		
18:3 w-3 (ALA)	22.0	4.2
20:5 w-3 (EPA)	9.3	0
22:5 w-3 (DPA)	2.3	0
22:6 w-3 (DHA)	6.3	0

Légende : PUFA, acide gras poly-insaturés; LA, acide linoléique; AA, acide arachidonique; ALA, acide alpha-linolénique; EPA, acide eicosapentanoïque; DPA, acide docosapentanoïque; DHA, acide docosahexanoïque.

4.3 Probiotiques

Parmi les groupes donneurs, 2 sous-groupes ont leur diète combinée avec des probiotiques (R. ω -3+P et R. ω -6+P). Les probiotiques sont une combinaison de *Bifidobacterium longum* R0175 et *Lactobacillus helveticus* R0052 (Probio'Stick fourni par Lallemand). Ils ont été administrés en les dissolvant dans leur eau de boisson quotidienne avec une concentration de 10^9 bactéries par jour. Le véhicule est la maltodextrine et était donné aux groupes véhicules.

4.4 Antibiotiques

Précédent la transplantation de microbiote, les receveurs reçoivent pendant 10 jours un mélange d'antibiotiques dans leur eau de boisson (ampicilline 1,25g/L, Aurobindo; imipenem/cilastatine 350 mg/L, Sandoz; vancomycine 600 mg/mL, Sandoz; metronidazole 60 mg/L, Hospira; ciprofloxacine 40 mg/L, Sandoz) afin de supprimer leur microbiote intestinal comme décrit dans Kelly et al. (142). Les antibiotiques sous forme de poudre (ampicilline, imipenem et vancomycine) sont dissous dans du dextrose 5% préalablement. La quantité d'eau bue par les rats était monitorée quotidiennement pour vérifier qu'une quantité suffisante était consommée.

4.5 Transplantation du microbiote fécal

La transplantation du microbiote fécal est effectuée par l'ingestion d'un cube de gélatine (Knox) contenant le microbiote des rats donneurs et commence 3 jours après l'arrêt de l'antibiothérapie et se déroule pendant 10 jours. De 6 à 10 fèces fraîches des rats donneurs par groupe sont récoltées chaque jour. Les bactéries intestinales sont isolées par homogénéisation des fèces dans du PBS stérile 1X (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,76 mM KH₂PO₄), à l'aide d'un homogénéisateur (Polytron), puis sont centrifugées (3000g, 1 min, 4°C). La concentration en bactéries du surnageant est alors estimée à l'aide de l'absorbance à 600nm mesurée avec un spectrophotomètre (Varian-Cary 50 Bio). Une dilution pour avoir 10¹⁰ bactéries transplantées par rat est effectuée. Le surnageant prélevé pour la transplantation est centrifugé (3000 g, 15 min, 4°C). Le surnageant est jeté et le culot est resuspendu avec 500 µL de PBS stérile par rat. Pour chaque rat, 500 µL de cette solution est mélangé avec la gélatine. De plus, 0,5g de sucrose est ajouté aux cubes de gélatine contenant les bactéries. Les cubes de gélatine sont servis aux rats receveurs correspondant directement dans leur cage. La viabilité des bactéries n'a pas été vérifiée après l'étape de l'insertion dans la gélatine.

4.6 Procédure chirurgicale

Pour l'induction de l'ischémie chez les rats receveurs, ils ont été préalablement anesthésiés avec une injection intrapéritonéale de kétamine Narketan 10mg/ml, Vetoquinol) et xylazine (Xylamax 100mg/ml, Bimeda) avec des proportions respectives de 70mg et 10mg par kg. Les rats furent rasés au niveau de l'abdomen supérieur gauche, intubés et mis sous respirateur (RoVent, Kent Scientific) afin de maintenir leur anesthésie par ventilation d'isoflurane 1-2% (Baxter). Les rats furent placés sur une table branchée à une pompe thermique (HTP-1500) afin d'assurer le maintien de leur température corporelle à environ 37°C. Un oxymètre de pouls (Mouse STAT JR., Kent Scientific Corporation) fut installé sur une des pattes postérieures des rats pour prendre leur saturation d'oxygène (SPO₂) et leur fréquence cardiaque (FC) et un tensiomètre (CODA, Kent Scientific Corporation) fut également placé autour de la queue des rats pour avoir les données de pression artérielle (PA) à différents moments pendant la chirurgie. Une thoracotomie gauche fut ensuite réalisée dans le cinquième espace intercostal, pour permettre l'occlusion de l'artère coronaire descendante gauche avec l'aide d'une suture de soie 4-0 [Syneture; Covidien, Mansfield, MA, USA] et d'un tube à occlusion en plastique. L'ischémie du myocarde était confirmée par la présence d'une cyanose sub-épicardique ventriculaire (coloration bleutée). Après 30 minutes d'ischémie, le tube à occlusion fut retiré pour permettre la reperfusion du tissu ischémique.

Pour les rats receveurs avec 24h de reperfusion, la suture fut retirée de l'artère coronaire et le thorax fut fermé avec une suture en soie 0 [Syneture; Covidien], les muscles refermés avec une suture en soie 4-0 [Syneture; Covidien] et ensuite la peau avec une suture en soie 3-0 [Syneture; Covidien]. Finalement, une injection sous-cutanée d'analgésique (0,5mg/kg de buprénorphine) leur fut administrée après la chirurgie et le lendemain matin pour diminuer la douleur.

4.7 Sacrifice des rats à 15 minutes de reperfusion et récolte des organes

Après les 30 minutes d'occlusion, le tube à occlusion est retiré, commençant la période de reperfusion qui dure 15 minutes. Avant de retirer le cœur, le sang intracardiaque a été collecté dans un tube anticoagulant contenant de l'EDTA. Les tubes anticoagulants sont centrifugés (3000 g, 15 min, 4°C) pour isoler le plasma qui est ensuite conservé à -80°C. Ensuite, l'aorte, les veines et artères pulmonaires, et les veines caves sont coupées, afin de collecter le cœur qui est alors séparé en 2 parties : épicarde et endocarde et conservé à -80°C.

4.8 Sacrifice des rats à 24 heures de reperfusion et récolte des organes

Les rats sacrifiés après 24 heures de reperfusion ont été décapités la journée suivant la chirurgie. Le sang a été récolté dans des tubes anticoagulants contenant de l'EDTA. Les tubes de sang sont centrifugés (3000 g, 15 min, 4°C) pour isoler le plasma qui a été conservé à -80°C. Ensuite, l'aorte, les veines et artères pulmonaires, et les veines caves sont coupées, afin de prélever le cœur qui servira d'abord à la mesure de la taille de l'infarctus et sera ensuite séparé en 2 parties : épicarde et endocarde. L'intestin a également été collecté et a servi à la mesure de la résistance de la barrière intestinale.

4.9 Mesure de la taille de l'infarctus

Pour la mesure de l'infarctus chez les rats sacrifiés après 24 heures, les cœurs sont lavés avec de la saline (0,9%) par reperfusion rétrograde dans l'aorte. Puis, l'artère coronaire descendante gauche est occluse une deuxième fois au même endroit afin d'observer la zone à risque. Pour ce faire, du Bleu d'Evans (0,5% dans de la saline) est infusé par l'aorte afin de délimiter la zone non à risque de la zone à risque (ZR) qui elle n'aura pas de coloration bleue. Le cœur est tranché transversalement en 4 tranches d'environ 2 mm d'épaisseur après avoir été congelé à -80°C durant 5 minutes. Les tranches sont lavées dans une solution de chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium (TTC) (1%, pH 7,4) (10 min, 37°C),

permettant de colorer en rouge vif la zone non-nécrosée, délimitant la zone infarctée (I) de la zone encore vivante. En effet, le TTC ne colore que les régions vivantes. En utilisant les tranches de cœur, la taille de l'infarctus est exprimée par un ratio de la surface des cellules mortes sur la zone à risque ($[I/ZR]*100$). La zone à risque, elle, est exprimée par un ratio de la surface ischémique sur la surface du ventricule gauche (VG), où a eu lieu l'occlusion ($[ZR/VG]*100$).

4.10 Résistance intestinale

Lors des sacrifices des rats de 24h de reperfusion, une section du duodénum de 5 cm est prélevée à environ 10 cm du pylore. Cette section est ensuite placée dans une chambre de Ussing pour calculer sa résistance électrique ainsi que sa perméabilité au FITC-dextran. Le bout de l'intestin prélevé est sectionné de manière à ouvrir ce dernier et que la muqueuse se retrouve d'un côté et la séreuse de l'autre. L'intestin est mis sur une cassette et placé dans la chambre de Ussing (Physiologic Instruments) et un tampon Ringer (115mM NaCl, 2.4mM K_2HPO_4 , 0.4mM KH_2PO_4 , 25mM $NaHCO_3$, 1.2 mM $MgCl_2$ et 1.2mM $CaCl_2$, pH de 7.3) est mis de chaque côté de la chambre pour la calibration initiale. Ensuite, un tampon mannitol 10mM (dans tampon Ringer) est mis du côté de la muqueuse et un tampon glucose 10mM (dans tampon Ringer) est placé du côté de la séreuse. La résistance est alors mesurée électriquement et les données sont acquises avec le logiciel «Data Acquisition- Acquire and Analyze» (Physiologic Instruments).

Après 15 minutes, 5mg de FITC-Dextran (Sigma-Aldrich) est mis du côté de la muqueuse pour mesurer la diffusion de celui-ci à travers l'intestin. La fluorescence du côté de la séreuse est mesurée à 30, 60 et 90 minutes en utilisant un spectrofluoromètre (Cary Eclipse) à une excitation de 485nm et une émission de 538nm. La chambre est continuellement oxygénée tout au long de l'expérience et gardée à une température de 37°C pour prévenir la mort cellulaire.

4.11 Concentration plasmatique de LPS

Les échantillons de plasma ont été préparés dans un tampon MAPK (20% Mix 5X pH 7.5 (50mM Tris-HCl, 20mM β -glycérophosphate, 20mM de sodium fluoride, 5mM EDTA, 10mM EGTA, 1mM Na_3VO_4), 1.6mM de benzamidine, 2.5M PMSF, 1M leupeptine, 5M DTT, 1M microcystine, 100M Triton X-100) et une concentration finale de 200 μg de protéines a été ajouté dans une plaque à ELISA. Les mesures ont été prises en accord avec les instructions fournies par le fournisseur (Rat LPS ELISA kit, MyBioSources [cat : MBS268498]).

4.12 Activité de la myéloperoxydase (neutrophiles)

Des échantillons du tissu cardiaque de la région endocardique sont pesés (environ 0.3 g) et transférés dans un tube eppendorf 1,5 mL. Deux cents μL d'une solution de bromide d'hexadecyltrimethylamonium (HTAB) (0,5 % HTAB 50 mM, pH 6,0) sont ajoutés aux tubes. Les tissus sont ensuite lysés par sonification et soumis à trois cycles de gel (azote liquide)/dégel (plaque chauffante à 37°C). Les lysats sont centrifugés (20 000 g, 15 min, 4°C). Cent μL du surnageant sont ajoutés à 2,9 mL d'une solution de sodium de phosphate 50 mM (0,167 mg/mL chlorydrate d'O-dianisidine, pH 6,0 et 0,0005 % de peroxyde d'hydrogène). L'essai enzymatique consiste à mesurer l'absorbance par spectrophotométrie (Varian-Cary 50 Bio) à une longueur d'onde de 460 nm à chaque 10 secondes pendant deux minutes. L'activité de la MPO est estimée à partir du calcul $([\text{absorbance maximale-minimale}]/\text{poids de la tranche mesurée [g]})/2$. Cette mesure permet de mesurer l'accumulation de neutrophiles dans l'endocarde suite à l'infarctus du myocarde.

4.13 Mesure de l'activation de la voie RISK (phosphorylation de AKT) et de la voie NF-kappa B dans l'endocarde

Préparation des échantillons et migration sur gel de polyacrylamide

Les tissus cardiaques de la région endocardique sont homogénéisés par sonification dans du tampon MAPK. Les tissus homogénéisés sont incubés (30 min) sur glace et ensuite centrifugés (13 000 g 15 min, 4°C). Un dosage par la méthode de Lowry permet de déterminer la concentration de protéines dans le

surageant de chaque échantillon. Ensuite, 100 µg de protéines de chaque échantillon est mélangé avec 10µL de tampon de chargement (orange 4X protein Buffet, Mandel Scientific) et un volume variable de tampon MAPK afin d'obtenir un volume total de 40µL à charger dans les puits du gel. Une échelle de poids moléculaire (PM; BLUelf Prestained Protein Ladder FroggaBio) est aussi chargée dans l'un des puits de chaque gel afin de faciliter l'identification des bandes protéiques en fonction de leur poids moléculaire.

Migration de protéines et transfert sur membrane de nitrocellulose

Les «running» gels utilisés pour la séparation des protéines contiennent 10% d'acrylamide (Acrylamide 30% - Bisacrylamide 0.8%, Tris 0.72 pH 8.8, SDS 10%, ammonium persulfate (APS) 1%, 5 µL de tetramethylethylenediamine (TEMED)) et sont coulés dans un montage pour Western Blot (Mini-Protean Tetra System, Bio-Rad). Après polymérisation, les échantillons sont chargés dans les puits. La migration est effectuée à 150V pendant environ 1 heure ou jusqu'à l'atteinte d'une séparation protéique adéquate dans un tampon de migration (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1.76mM KH₂PO₄). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose à l'aide du système du système à sec TurboBlot de BioRad dans un tampon de transfert (5.82 g/L de Tris-Base, 2.93 g/L de glycine, 3.75 ml/L de SDS 10%, 200 ml/L de méthanol, complété avec de l'eau distillée).

Révélation des protéines d'intérêt

La détection des protéines d'intérêt (p-Akt(Ser473), p-Akt(Thr308), Akt, pNF-κB et NF-κB) est effectuée à l'aide du système SNAP i.d. 2.0 (Millipore, Etobicoke, Ontario, Canada). Les sites non-spécifiques sont bloqués à l'aide du Odyssey Blocking Buffer (Li-Cor, Lincoln, Nebraska, USA) ratio 1 :1 avec du PBS 1X sur la membrane sous agitation pendant 20 minutes. Tous les anticorps sont dilués dans une solution à ratio 1 :1 de Blocking Buffer et PBS 1X contenant 0.2% de Tween20. La membrane est ensuite incubée pour 15 minutes sous agitation

avec l'anticorps primaire (1 : 1000) correspondant. L'excès d'anticorps non-lié est lavé avec du PBS 1X à l'aide de 5 lavages consécutifs. Les membranes sont ensuite incubées 10 minutes sous agitation avec l'anticorps secondaire (1 :1000) (Goat anti-rabbit IRDye 800CW, Li-Cor) dans une solution ayant un ratio 1 :1 de Blocking Buffer et PBS 1X contenant 0.2% de Tween20. Ensuite, la membrane est lavée 5 fois avec une solution de 1% de Tween20 dans du PBS 1X. Les membranes sont séchées à 37°C pendant 5 minutes et lues par le scan Odyssey CLX de Li-Cor. L'intensité des bandes lumineuses est quantifiée à l'aide du logiciel Image Studio 3.1. Finalement, les membranes sont placées dans un tampon de déshybridation (100mM glycine, 1% SDS, pH 2) pendant 1 heure sous agitation pour retirer les anticorps.

Les anticorps primaires utilisés sont : Akt Rabbit antibody (9272S, Cell Signaling technology), p-Akt Rabbit antibody S473 (4060S, Cell Signaling technology), p-Akt Rabbit antibody T308 (13038S, Cell Signaling technology), P-NF-kappaB p65 Rabbit mAb (3033S, Cell Signaling technology), et NF-kappaB p65 Rabbit mAb (8242S, Cell Signaling technology).

4.14 Séquençage de l'ARN ribosomal (ARNr) 16S du microbiote intestinal

La composition du microbiote intestinal des échantillons de fèces prélevés chez les rats receveurs avant leur sacrifice est mesurée en utilisant le séquençage de l'ARNr 16S pour déterminer l'abondance relative et la diversité des espèces bactériennes présentes. L'ADN a été extrait des fèces en utilisant un tampon de lyse contenant des lysozymes, protéinase K et SDS 10%. Après l'extraction au phénol-chloroforme, l'ADN est précipité et ensuite resuspendu pour être purifié avec le DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen). Le rendement en ADN est mesuré avec le Picogreen (ThermoFisher). L'ADN est ensuite utilisé pour l'amplification 16S de la région V3-V4 en utilisant les amorces 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') et 805R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'), pour incorporer un adaptateur Illumina Nextera (Illumina, USA) et une séquence pour le séquençage multiplexé. Le séquençage à haut débit (HTS) est fait sur une

plateforme MiSeq en utilisant le séquençage «2 x 300 bp paired-end» (Illumina) selon les instructions du fabricant. Les unités taxonomiques opérationnelles (OTU) sont appliquées par une coupure à 97% de similarité pour discriminer les espèces.

4.15 Analyses statistiques

GraphPad-Prism 8 (San Diego, USA) est utilisé pour les analyses statistiques. Un $p < 0.05$ est considéré comme une différence significative. Tous les résultats sont exprimés en moyenne \pm erreur-standard. La comparaison des quatre groupes entre eux est effectuée par ANOVA bidirectionnelle en utilisant la diète et le traitement comme facteurs principaux. Lorsque l'interaction était significative, l'ANOVA était suivie d'une décomposition afin de connaître les effets simples.

Chapitre 5. Résultats

5.1 Données hémodynamiques

Le microbiote provenant de donneurs sous diète enrichie en ω -6 augmente significativement la pression artérielle au repos des receveurs par rapport à celle des receveurs du microbiote ω -3, et ceci indépendamment de l'ajout de probiotiques dans la diète des donneurs. Il n'y a aucune différence significative entre les groupes au niveau de la fréquence cardiaque et du double produit.

La pression artérielle (PA) et la fréquence cardiaque (FC) étaient mesurées avant le début de la chirurgie pour l'occlusion de l'artère coronaire, une fois que les rats étaient endormis. La figure 2A présente la pression artérielle moyenne au repos pour chaque groupe. Ces résultats montrent que la pression artérielle des receveurs du microbiote ω -6 augmente significativement par rapport à celle des receveurs du microbiote ω -3. Cela est confirmé par une ANOVA bidirectionnelle où $F(1,47) = 5,689$; $p < 0,05$ entre la diète ω -3 ($85,0 \pm 3,5$ mm Hg) et la diète ω -6 ($97,9 \pm 4,2$ mm Hg). L'ajout de probiotiques à la diète des donneurs ne modifie pas significativement la pression sanguine des receveurs au repos. Aucune différence significative n'a été observée entre les groupes pour la fréquence cardiaque ou le double produit, qui est une estimation du travail cardiaque. Le double produit a été calculé en utilisant la formule suivante : $((PA \times FC)/100)$.

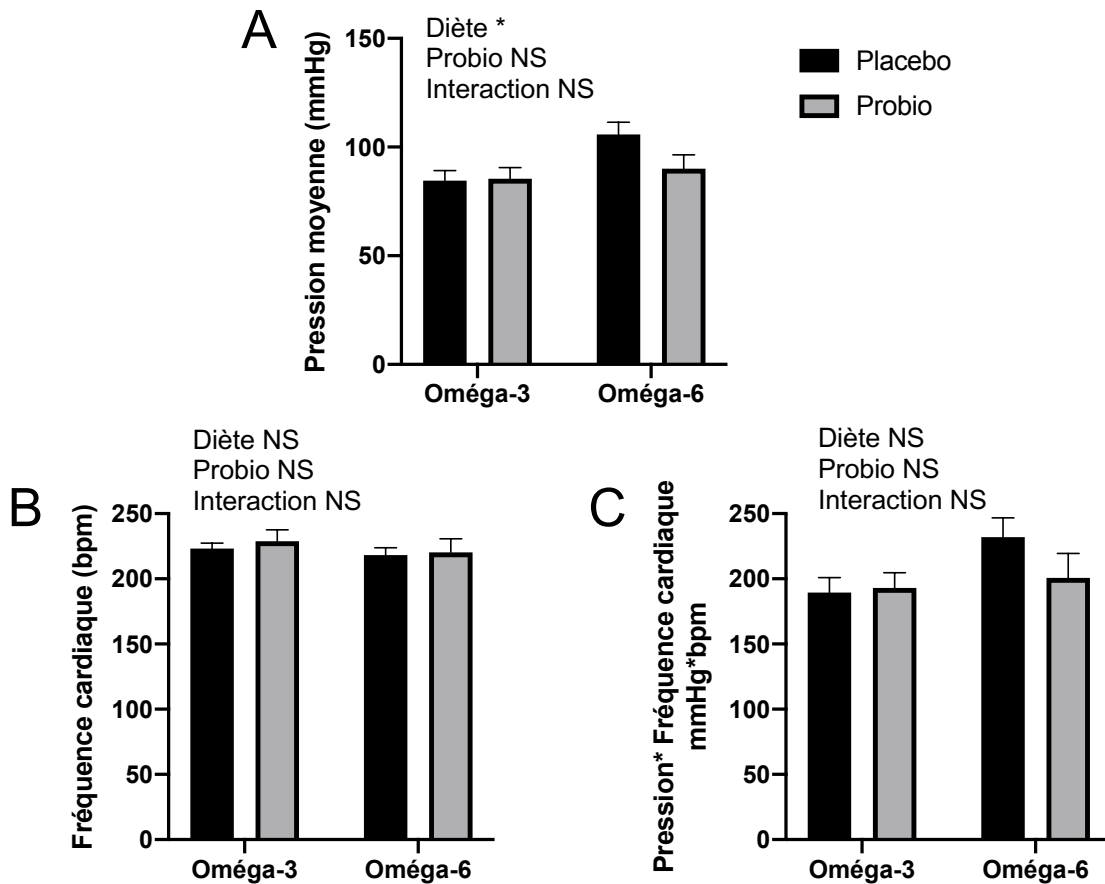


Figure 2. Données hémodynamiques des rats au repos avant la chirurgie. (A) La pression artérielle moyenne des rats a été mesurée à l'aide d'un tensiomètre installé sur la queue et (B) la fréquence cardiaque avec un oxymètre de pouls. Celles-ci ont été mesurées juste avant le début de la chirurgie, une fois les rats endormis. La pression est exprimée en mm Hg et la fréquence cardiaque en battements par minute (bpm). (C) Le double produit a également été calculé $((PA \times FC)/100)$. Les données sont présentées pour les groupes suivants : les receveurs du microbiote ω -3 (N=15), les receveurs du microbiote ω -3 avec probiotiques (N=15), les receveurs du microbiote ω -6 (N=12) et les receveurs du microbiote ω -6 avec probiotiques (N=9). * : $p < 0,05$; NS : Non significatif.

5.2 Taille de l'infarctus

Les receveurs du microbiote ω -6 présentent une taille d'infarctus significativement plus élevée, alors que la combinaison des ω -6 et des probiotiques dans la diète des donneurs diminue la taille d'infarctus des receveurs à un niveau similaire à celle observée chez les receveurs du microbiote ω -3, avec ou sans probiotiques (figure 3).

La taille de l'infarctus résultant de l'ischémie a été mesurée chez les rats sacrifiés après 24 heures de reperfusion. Pour cela, trois mesures ont été prises: la surface infarctée (I), la surface de la zone à risque (ZR) et la surface du ventricule gauche (VG). La figure 2 présente les ratios de chaque groupe pour I/ZR et ZR/VG. Le ratio I/ZR (figure 2A) présente la proportion du tissu mort dans la zone ischémique et le ratio ZR/VG (figure 2B) présente la proportion du ventricule gauche ayant subi l'ischémie. Les facteurs de la diète et de la prise de probiotiques ont une influence significative sur la taille de l'infarctus. L'interaction entre ces facteurs était également significative ($F(1, 33) = 6,423$; $p < 0,05$) démontrant que le microbiote ω -6 sans probiotiques augmente significativement la taille de l'infarctus, par rapport aux microbiotes ω -3 avec ou sans probiotiques et ω -6 avec probiotiques. On observe une taille de l'infarctus plus grande dans le groupe R. ω -6 en comparaison avec les autres groupes. Il n'y a pas de différence significative en ce qui concerne le ratio ZR/VG entre les quatre groupes.

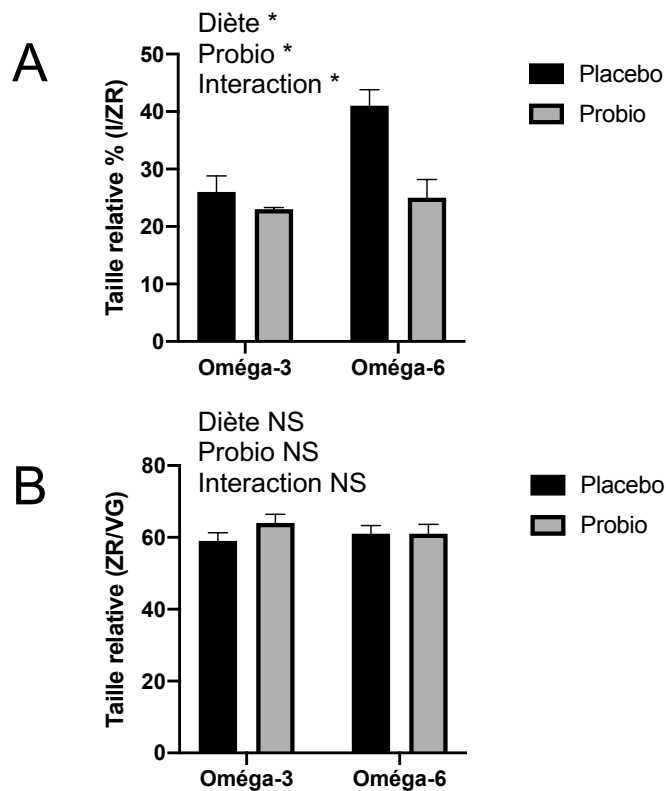


Figure 3. Effets des probiotiques ajoutés à une diète sur la taille de l'infarctus du myocarde après 24 heures de reperfusion. (A) La mesure de la taille de l'infarctus est exprimée en %. Elle est représentée par le ratio de la zone infarctée (I) sur la zone à risque (ZR). (B) ZR/VG présente le ratio entre la zone à risque sur la surface du ventricule gauche (VG), exprimé également en %. Ces mesures ont été prises après 24h de reperfusion. Les données des groupes suivants sont présentées dans le graphique : les receveurs du microbiote ω -3 (N=10), les receveurs du microbiote ω -3 avec probiotiques (N=9), les receveurs du microbiote ω -6 (N=10) et les receveurs du microbiote ω -6 avec probiotiques (N=8). * : $p < 0,05$; NS : Non significatif.

5.3 Résistance intestinale

Les receveurs du microbiote ω -6 présentent une résistance intestinale significativement plus faible, alors que la combinaison des ω -6 et des probiotiques dans la diète des donneurs augmente la résistance intestinale des receveurs à un niveau similaire à celle observée chez les receveurs du microbiote ω -3, avec ou sans probiotiques (figure 4).

Les résistances intestinales ont été mesurées à l'aide de 2 méthodes pour les rats sacrifiés après 24 heures de reperfusion. D'abord, la résistance électrique a été observée en utilisant une chambre de Ussing et est exprimée en Ohms (Ω) (figure 3A). Le microbiote ω -6 diminue significativement la résistance intestinale par rapport aux microbiotes des autres groupes. En effet, l'interaction entre les facteurs de la diète et la prise de probiotiques est significative ($F(1, 26) = 4,260$; $p < 0,05$). Ensuite, de manière à s'assurer que la barrière intestinale était bel et bien affectée par le microbiote, la perméabilité intestinale au FITC-dextran intestinal a également été observée (figure 3B). Le résultat obtenu représente la concentration de FITC-dextran se trouvant du côté de la séreuse dans la chambre de Ussing 90 minutes suivant l'injection de dextran du côté de la muqueuse. L'interaction des facteurs diète et prise de probiotiques est également significative ($F(1, 34) = 9,678$; $p < 0,05$) montrant que le FITC-dextran passait davantage à travers la barrière intestinale des R. ω -6 en comparaison avec les autres groupes.

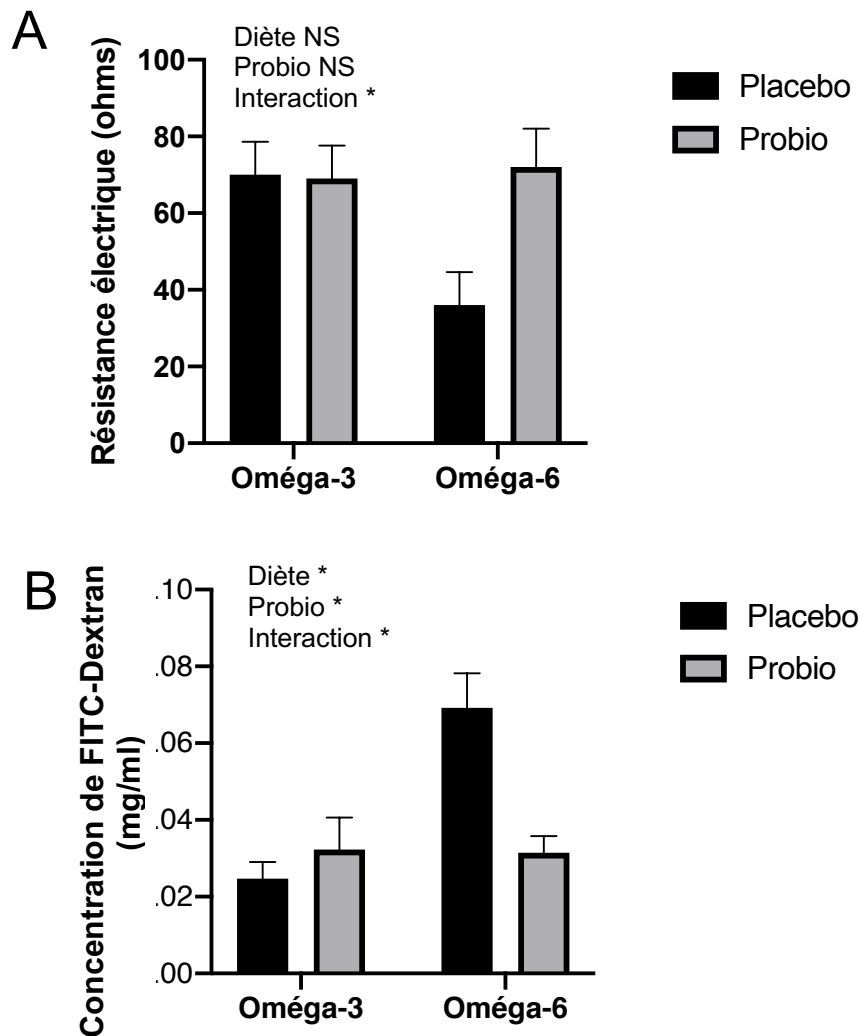


Figure 4. Effet du microbiote sur la résistance intestinale après 24 heures de reperfusion. (A) La résistance intestinale électrique a été mesurée 24 heures après l'infarctus, à l'aide des chambres de Ussing et est présentée en ohms. (B) La concentration de FITC-dextran du côté de la séreuse après 90 minutes mesurée en spectrofluorométrie. Le graphique présente les données pour les receveurs du microbiote ω -3 (N=8), les receveurs du microbiote ω -3 avec probiotiques (N=8), les receveurs du microbiote ω -6 (N=8) et les receveurs du microbiote ω -6 avec probiotiques (N=6). * : $p < 0,05$; NS : Non significatif

5.4 Concentration plasmatique de lipopolysaccharides (LPS)

La concentration plasmatique de LPS est significativement diminuée chez les rats receveurs de microbiote avec probiotiques ajoutés, indépendamment de l'enrichissement de la diète (figure 5).

La concentration plasmatique de LPS a été mesurée par ELISA chez les rats sacrifiés après 24 heures de reperfusion et est exprimée en ng/mL. La figure 4 montre que la concentration plasmatique de LPS est significativement diminuée chez les rats receveurs du microbiote contenant des probiotiques, indépendamment de la nature de la diète. Cela est confirmé par une ANOVA bidirectionnelle où $F(1,29) = 4,558; p < 0,05$ entre le groupe placebo ($25,55 \pm 1,13$ ng/mL) et le groupe probiotique ($21,55 \pm 1,50$ ng/mL). L'enrichissement de la diète des donneurs n'a pas d'effet significatif sur la concentration plasmatique de LPS des receveurs, malgré une tendance montrant une concentration plus élevée chez le groupe ω -6.

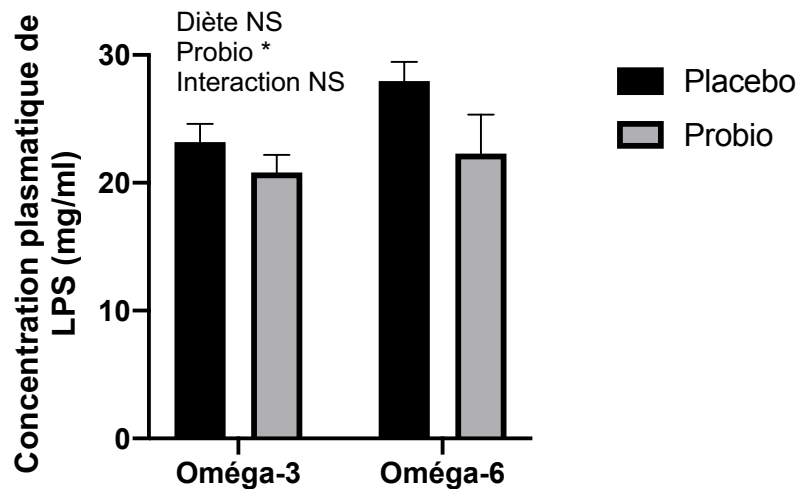


Figure 5. Effets des probiotiques sur la concentration plasmatique de LPS après 24 heures de reperfusion. La concentration de LPS a été mesurée par ELISA et est exprimée en ng/mL. Le graphique présente les données pour les receveurs du microbiote ω -3 (N=10), les receveurs du microbiote ω -3 avec probiotiques (N=6), les receveurs du microbiote ω -6 (N=11) et les receveurs du microbiote ω -6 avec probiotiques (N=6). * : $p < 0,05$; NS : Non significatif.

5.5 Activité de la myéloperoxydase (neutrophiles)

L'ajout de probiotiques dans la diète des donneurs diminue l'activité de la myéloperoxydase (MPO) dans la région endocardique lors de l'infarctus des receveurs, indépendamment de la diète (figure 6).

L'activité de la MPO représente une estimation de l'accumulation de neutrophiles dans la région endocardique à la suite d'un infarctus. Cette activité a été mesurée dans la région endocardique de rats qui ont été sacrifiés après 24 heures de reperfusion. L'activité est mesurée par essai enzymatique, puis par spectrophotométrie. En utilisant le groupe receveur du microbiote ω -3 comme valeur de référence, la figure 5 montre que l'ajout de probiotiques dans la diète des donneurs diminue significativement l'activité de la MPO chez les receveurs de ce microbiote à la suite d'un infarctus. Cela est confirmé par une ANOVA

bidirectionnelle où $F(1,36) = 13,633$; $p < 0,05$ entre le groupe placebo ($136,40 \pm 17,97 \%$) et le groupe probiotique ($44,96 \pm 17,05 \%$), sans tenir compte de la diète des donneurs. L'enrichissement de la diète des donneurs n'a pas d'effet significatif sur l'activité de la MPO chez les receveurs. Toutefois, il semble y avoir une tendance montrant une activité plus élevée chez le groupe ω -6.

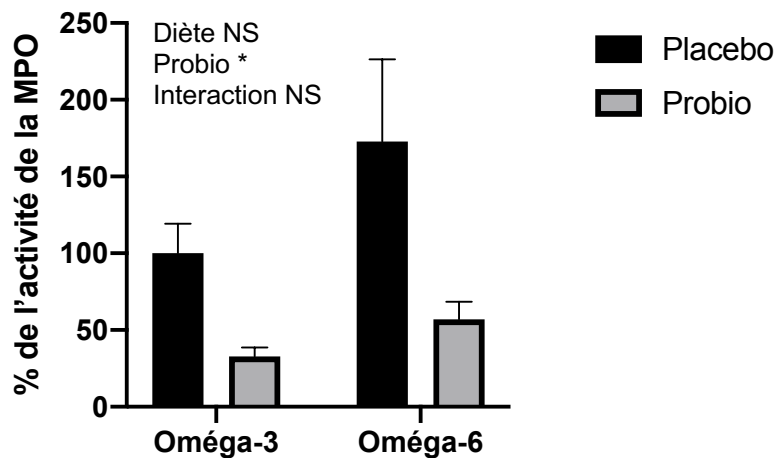


Figure 6. Effets du microbiote intestinal des donneurs sur l'activité de la MPO dans la région endocardique des receveurs après 24 heures de reperfusion. L'activité de la myéloperoxydase (MPO) est mesurée par spectrophotométrie et un rapport avec le poids de l'échantillon est calculé. Les valeurs présentées sont comparées au groupe ω -3 et sont exprimées en pourcentage de celui-ci. Le graphique présente les données pour les receveurs du microbiote ω -3 (N=11), les receveurs du microbiote ω -3 avec probiotiques (N=12), les receveurs du microbiote ω -6 (N=8) et les receveurs du microbiote ω -6 avec probiotiques (N=9). * : $p < 0,05$; NS : Non significatif.

5.6 Activation de la voie NF-kappa B dans la région endocardique

L'activation du facteur nucléaire NF-κB est augmentée chez les rats receveurs du microbiote ω-6, alors que l'ajout de probiotiques à ce microbiote maintient l'activation de NF-κB à un niveau similaire à la valeur de celle des autres groupes (figure 7).

L'activation du facteur nucléaire NF-κB est mesurée par immunobuvardage dans les tissus de la région endocardique des rats receveurs avec 15 minutes de reperfusion. Un ratio de la fluorescence de l'enzyme phosphorylée (pNF-κB) sur NF-κB total a été calculé. En utilisant le groupe receveur du microbiote ω-3 comme valeur de référence, l'activation de NF-κB est calculée pour chaque groupe en pourcentage de ce dernier. L'interaction des 2 facteurs est significative ($F(1, 19) = 4,65$; $p < 0,05$). Chez les receveurs du microbiote ω-6, l'activité estimée de NF-κB est significativement plus élevée que chez les autres groupes. De plus, il y a une corrélation significative entre l'activation de la voie NF-κB et la concentration de LPS plasmatique que l'on retrouve dans chacun des groupes.

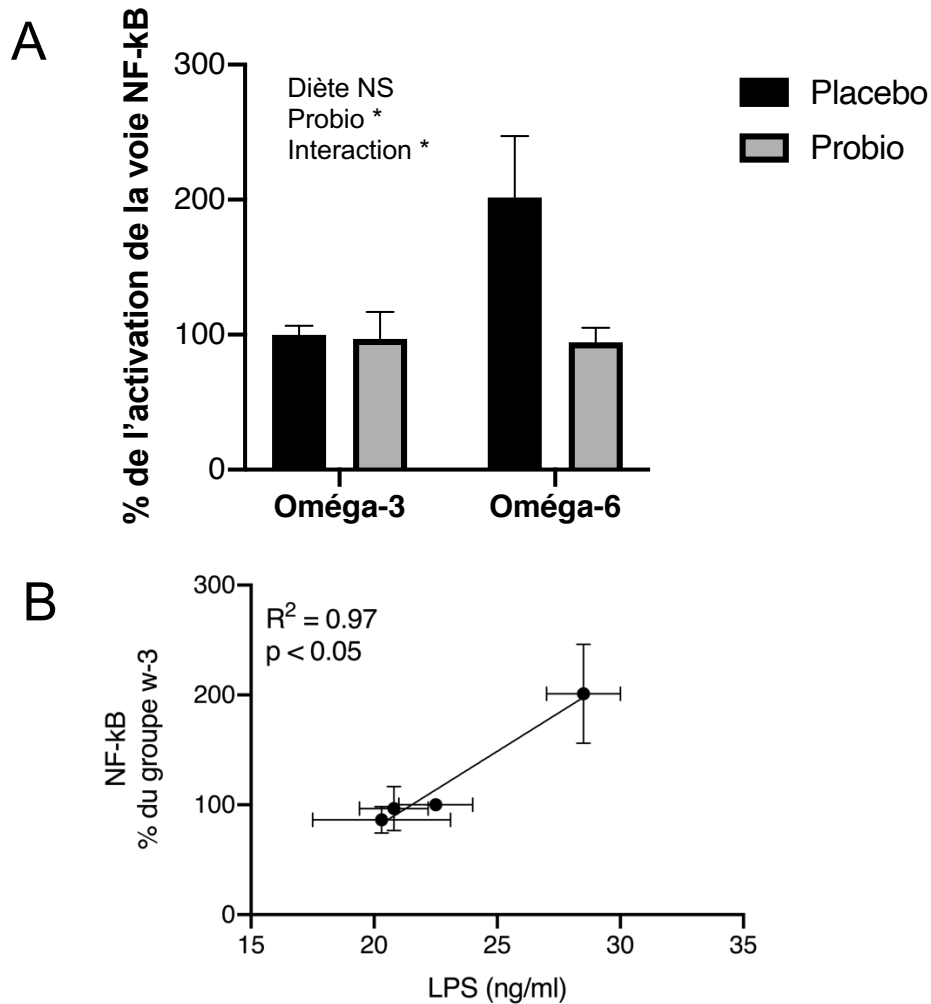


Figure 7. Effet du microbiote des donneurs sur l'activité du facteur nucléaire NF-κB dans la région endocardique des receveurs après 15 minutes de reperfusion. A) L'activité de NF-κB est mesurée par immunobuvardage. Les valeurs sont obtenues en calculant le ratio de la fluorescence de la forme phosphorylée (pNF-κB) sur le total NF-κB. B) L'activation de la voie NF-κB a été corrélée avec la concentration de LPS plasmatique. Les valeurs présentées sont comparées au groupe receveur du microbiote ω-3 et sont exprimées en pourcentage de celui-ci. Le graphique présente les données pour les receveurs du microbiote ω-3 (N=5), les receveurs du microbiote ω-3 avec probiotiques (N=7), les receveurs du microbiote ω-6 (N=5) et les receveurs du microbiote ω-6 avec probiotiques (N=6). * : $p < 0,05$; NS : Non significatif; R^2 : Coefficient de corrélation.

5.7 Activation de la voie de cardioprotection RISK

La phosphorylation de Akt(S) et Akt(T) est influencée significativement par le facteur de la diète et l'ajout de probiotique. Les receveurs du microbiote ω -3, ainsi que ceux recevant un microbiote ω -6 avec des probiotiques voient leur activation d'Akt(S) et Akt(T) augmentée (figure 8).

L'activation d' Akt(S) et Akt(T) est mesurée par immunobuvardage dans la région endocardique des rats receveurs avec 15 minutes de reperfusion. Un ratio de la fluorescence de chacune des enzymes activées sur Akt total a été calculé. En utilisant le groupe receveur du microbiote ω -3 comme valeur de référence, l'activation de pAkt(S) et pAkt(T) est calculée pour chaque groupe. D'abord, l'activation de Akt(S) est significativement augmentée par le microbiote provenant d'une diète ω -3 en comparaison avec celui provenant d'une diète ω -6 ($F(1, 19) = 5,552$; $p < 0,05$). L'effet de l'ajout de probiotique permet également d'augmenter significativement l'activation de Akt (S) ($F(1, 19) = 26,65$; $p < 0,05$) (figure 7A). Le même résultat est observable pour l'activation de Akt (T) (figure 7B). En effet, autant le microbiote provenant d'une diète ω -3 ($F(1, 17) = 6,630$; $p < 0,05$) que le microbiote provenant de rat ayant eu des probiotiques ($F(1, 17) = 23,38$; $p < 0,05$) augmente la phosphorylation d'Akt(T) chez les receveurs.

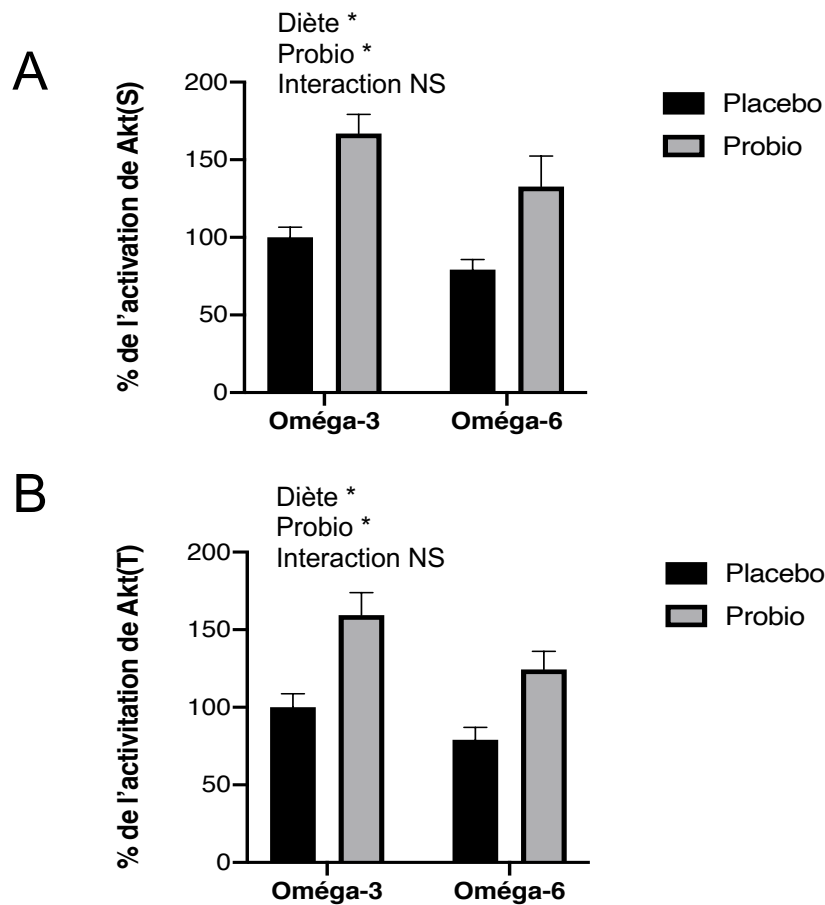


Figure 8. Effets du microbiote sur l'activité de la voie de survie cellulaire RISK dans la région endocardique après 15 minutes de reperfusion chez les receveurs. L'activité d'Akt est mesurée par immunobuvardage. Les valeurs sont obtenues en calculant le ratio de la fluorescence de la forme activée (A) pAkt(s) ou (B) pAkt(t) sur Akt total. Les valeurs présentées sont comparées au groupe receveur du microbiote ω -3 et sont exprimées en pourcentage de celui-ci. Le graphique présente les données pour les receveurs du microbiote ω -3 : N=6, les receveurs du microbiote ω -3 avec probiotiques : N=6; les receveurs du microbiote ω -6: N=6 et les receveurs du microbiote ω -6 avec probiotiques : N=6. * : $p < 0,05$; NS : Non significatif.

5.8 Le ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* dans le microbiote des receveurs

Les receveurs du microbiote ω -6 présentent un ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* plus élevé, alors que la combinaison des ω -6 et des probiotiques dans la diète des donneurs ramène ce ratio à un niveau similaire observé chez les receveurs du microbiote ω -3, avec ou sans probiotiques (figure 9).

Les ratios *Firmicutes/Bacteroidetes* ont été calculés grâce au séquençage de l'ARN ribosomal 16S des microbiotes des receveurs prélevés le jour du sacrifice de ces derniers. Une ANOVA bidirectionnelle a permis de déterminer que l'interaction entre les facteurs diète et probiotique était significative ($F(1, 20) = 4,358$). En effet, le microbiote ω -6 présente un ratio significativement plus élevé par rapport aux microbiotes des autres groupes.

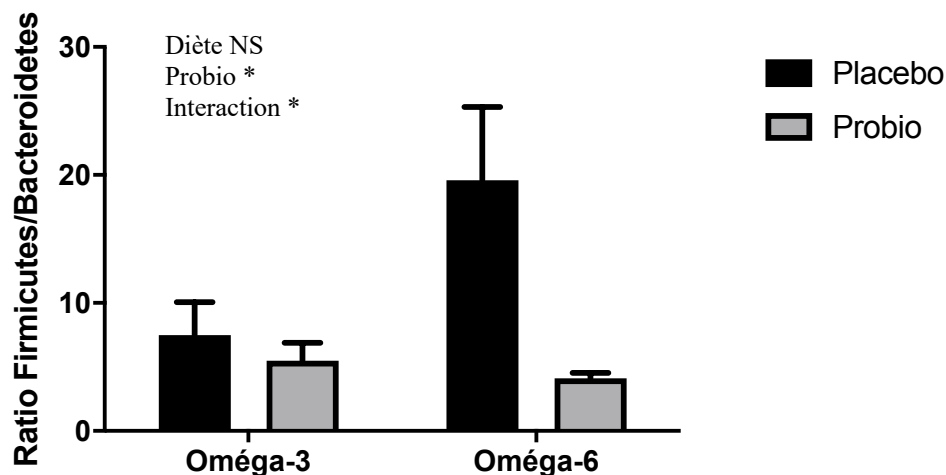


Figure 9. Ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* du microbiote des receveurs prélevé le jour du sacrifice. Les valeurs ont été obtenues en faisant le séquençage de l'ARNr 16S du microbiote. Le graphique présente les données pour les receveurs du microbiote ω -3 : N=6, les receveurs du microbiote ω -3 avec probiotiques : N=6; les receveurs du microbiote ω -6: N=6 et les receveurs du microbiote ω -6 avec probiotiques : N=6. * : $p < 0,05$; NS : Non significatif.

5.9 Comparaison du microbiote des receveurs

Le séquençage de l'ARNr 16S du microbiote des receveurs a permis également d'observer des différences significatives chez certaines espèces. En effet, des bactéries comme les Entérobactéries (figure 10A), les *Clostridium* (figure 10B), les *Akkermensia* (figure 10C) et les *Roseburia* (figure 10D) sont représentées en quantité différente dépendamment de la diète et de la prise de probiotiques.

L'analyse du microbiote a permis de voir des différences dans l'expression de certaines bactéries. D'abord, il y a les effets simples des facteurs diètes et probiotiques qui influencent significativement le nombre d'entérobactéries retrouvées dans le microbiote. Une diète enrichie en ω -6 augmente le nombre d'entérobactéries ($F(1, 20) = 12,39$; $p < 0,05$) et l'ajout de probiotiques les diminue ($F(1, 20) = 6,127$; $p < 0,05$).

Le microbiote provenant d'une diète enrichie ω -6 sans l'ajout de probiotiques contenait un nombre plus élevé de *Clostridium* que les autres groupes, l'interaction entre les 2 facteurs étant significative ($F(1, 20) = 48,86$; $p < 0,05$). L'ajout de probiotique permet de ramener la quantité de *Clostridium* au même niveau que les groupes provenant de diète riche en ω -3.

Pour leur part, les *Akkermensia* et les *Roseburia* sont significativement moins exprimées dans le microbiote enrichi en ω -6 sans probiotiques que dans les autres groupes, l'interaction entre les 2 facteurs étant significative autant pour les *Akkermensia* ($F(1, 20) = 10,30$; $p < 0,05$), que pour les *Roseburia* ($F(1, 20) = 18,52$; $p < 0,05$). L'ajout de probiotique permet de ramener la quantité de *Akkermensia* et *Roseburia* au même niveau que les groupes provenant de diète riche en ω -3.

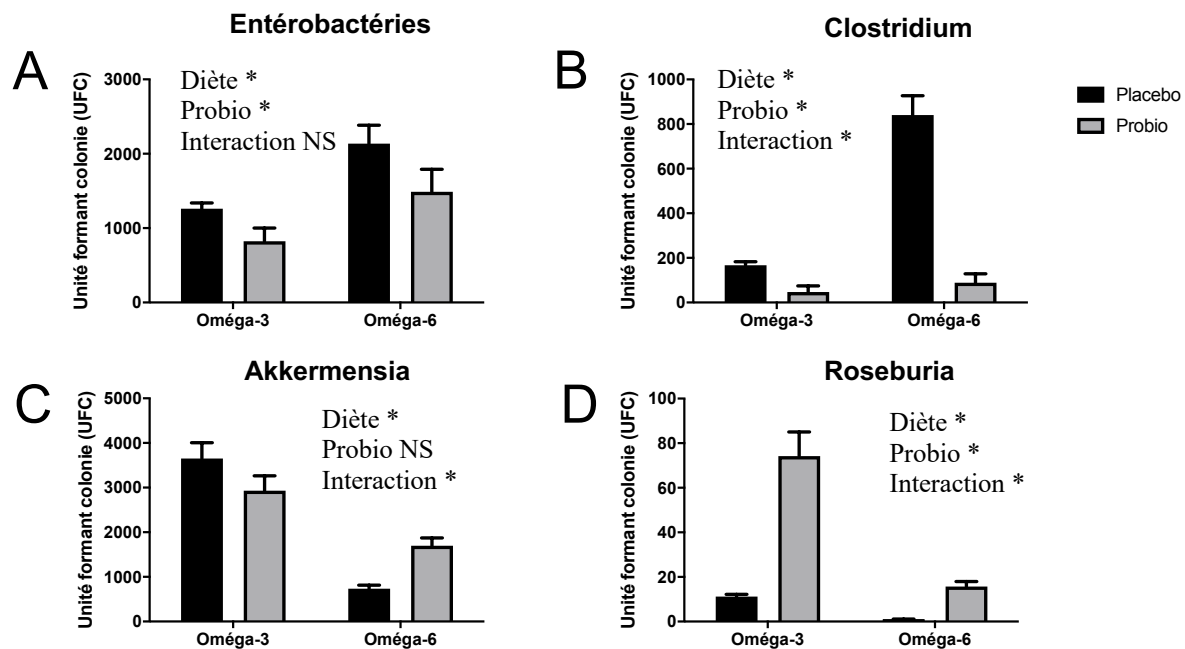


Figure 10. Comparaison de la composition du microbiote des receveurs prélevé le jour du sacrifice. Les valeurs ont été obtenues en faisant le séquençage de l'ARNr 16S du microbiote, permettant d'observer l'expression des (A) Entérobactéries, (B) Clostridium, (C) Akkermensia et (D) Roseburia. Le graphique présente les données pour les receveurs du microbiote ω -3 : N=6, les receveurs du microbiote ω -3 avec probiotiques : N=6; les receveurs du microbiote ω -6: N=6 et les receveurs du microbiote ω -6 avec probiotiques : N=6. * : $p < 0,05$; NS : Non significatif.

Chapitre 6. Discussion

La présente étude s'attarde sur l'effet d'un microbiote provenant d'une diète enrichie soit en ω -3 ou en ω -6 avec ajout des probiotiques sur la perméabilité intestinale et sur les conséquences d'une ischémie myocardique. La comparaison des groupes selon les différents facteurs évalués au cours du projet permet de confirmer que le microbiote influence certains effets relatifs à l'ischémie myocardique. Les seules diètes étudiées dans cette étude sont les diètes enrichies en ω -3 ou en ω -6, car ces diètes représentent la différence entre la diète méditerranéenne (qui contient davantage de ω -3) et la diète occidentale (qui contient plus de ω -6). Les diètes standards données normalement aux rats ne contiennent pas ou très peu d'acide gras ω -3 et ω -6, ce qui ne permettrait pas d'observer les effets du ratio ω -3/ ω -6 sur le microbiote.

Nous observons que les receveurs ω -6, sans tenir compte de l'ajout ou non de probiotiques, ont une pression sanguine au repos significativement plus élevée que les receveurs de microbiote provenant de la diète enrichie en ω -3. Dans une étude menée par Adnan et al.(143), ceux-ci ont observé que le microbiote de donneurs hypertendus était suffisant pour augmenter la pression sanguine de rats receveurs normotendus. Leur étude suggère donc que le microbiote a un rôle dans la pression artérielle (143) ce que nos résultats démontrent également.

Une diète riche en gras est liée à une dysbiose entre les bactéries qui composent le microbiote et augmentent la proportion de bactéries productrices de LPS, comme les *Enterobactéries*. Le microbiote d'une diète riche en ω -3 présente une réduction de la proportion de *Enterobactéries* par rapport à une diète riche en ω -6, ce que l'on observe également dans notre étude et une plus grande proportion de bactéries supprimeuses de LPS comme les *Bifidobactéries* (76). Les LPS, une fois dans la circulation sanguine, sont pro-inflammatoires et provoquent l'expression de cytokines comme IL-6 et TNF- α , deux cytokines qui peuvent être des facteurs de risque pour une augmentation de la pression

sanguine (144). Ainsi, le facteur de la diète module les bactéries associées au microbiote et influence la pression sanguine au repos, alors que les probiotiques ajoutés ne semblent pas avoir d'effets sur celle-ci, malgré le fait que les *Entérobactéries* sont réduites avec le microbiote provenant de donneurs prenant des probiotiques. Il est donc possible de penser que les bactéries responsables de la différence de la PA entre nos groupes ne soit pas influencées par la prise de probiotiques, mais seulement par les bactéries influencées par la prise d'une diète contenant un ratio ω -3/ ω -6 différent. En effet, le microbiote est un ensemble complexe de bactéries et chacune d'elle a un rôle différent.

La taille de l'infarctus est significativement augmentée chez les receveurs du microbiote ω -6 sans probiotiques comparativement aux autres groupes (figure 2). En effet, lorsque nous comparons les groupes selon la diète des donneurs, les groupes receveurs du microbiote ω -3, avec ou sans les probiotiques et le groupe receveur ω -6 avec probiotiques, présentent un ratio I/ZR significativement plus bas que le ratio I/ZR du groupe receveur de ω -6. Il est possible d'émettre l'hypothèse que les bactéries du microbiote associé à la diète ω -6 peuvent altérer la survie des cellules cardiaques, causant une taille d'infarctus plus élevée dans ce groupe (68).

La taille de l'infarctus observée dans le groupe receveur ω -6 peut être expliquée la composition du microbiote dérivant d'une diète ω -6. Dans la littérature, une diète riche en ω -6 est associée à une réduction des bactéries de type *Bifidobacterium* et des bactéries *Bacteroidetes* ainsi qu'à une plus grande concentration de bactéries productrices de LPS, comme des *Proteobactéries* et *Entérobactéries* (145, 146). Lorsque nous avons analysé le microbiote des receveurs ω -6, le ratio *Firmicutes/Bacteroidetes*, était effectivement plus élevé que celui provenant d'une diète enrichie en ω -3, et nous avons observé une augmentation des bactéries de type *Entérobactérie* et *Clostridium*, en plus d'une réduction de l'expression d'*Akkermensia* et de *Roseburia* (figure 9), 2 bactéries reconnues pour leur production de SCFA et leurs effets anti-inflammatoires (81, 147). Cependant, l'ajout de probiotiques (*Bifidobacterium longum* R0175 et

Lactobacillus helveticus R0052), des bactéries dites suppressives de LPS, peut venir contrer les effets des bactéries productrices de LPS d'une diète ω -6, et semble également selon nos résultats ramener les niveaux des *Clostridium*, *Akkermansia* et *Roseburia* à ceux des microbiotes provenant des diètes enrichies en ω -3, en plus de rétablir le ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* (145). Un mécanisme plausible qui pourrait expliquer l'augmentation de la taille de l'infarctus avec le microbiote ω -6 sans probiotique pourrait alors être que les LPS peuvent activer la voie TLR4/MyD88/NF- κ B, et provoquer l'expression de cytokines pro-inflammatoires, qui attirent alors des cellules immunitaires dans la zone ischémique et amplifient la réponse inflammatoire (36). Effectivement, l'ajout de probiotiques à la diète enrichie en ω -6 des donneurs modifie leur microbiote, qui est alors moins néfaste une fois transplanté et permet de réduire la taille de l'infarctus chez les receveurs à un niveau similaire de celui observée dans les groupes receveurs du microbiote ω -3.

Le rapport ZR/VG est similaire pour les quatre groupes, la différence entre les rapports I/ZR repose donc sur la taille de I et non la taille de ZR. Ainsi, l'ajout de probiotiques dans une diète enrichie en ω -6 module le microbiote des donneurs de façon à ce que la taille d'infarctus des receveurs soit réduite à un niveau similaire à la taille observée chez les receveurs du microbiote ω -3, avec ou sans probiotiques.

La résistance intestinale est également un sujet d'intérêt, car une perméabilité augmentée de la barrière intestinale permettrait le passage d'endotoxines et ainsi augmenterait l'inflammation systémique. Dans notre étude les receveurs du microbiote ω -6 sans probiotiques ont une résistance intestinale significativement diminuée contrairement aux trois autres groupes. Ceci est démontré autant par la résistance électrique obtenue grâce aux chambres de Ussing, que par le test de la perméabilité au FITC-dextran. Encore une fois, nous pouvons nous pencher sur la composition du microbiote associé aux diètes pour expliquer cette différence. En effet, les différences observées dans la composition

du microbiote pourraient expliquer une production réduite de SCFA et une augmentation de la production de LPS pouvant mener à une augmentation des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-4 et IL-13 dans les mastocytes de l'intestin. À leur tour, ceux-ci peuvent augmenter la perméabilité intestinale en réduisant l'expression des protéines de jonctions serrées, telles les claudines et l'occludine, créant ainsi un cercle vicieux entre la réduction de la résistance intestinale, l'entrée de LPS dans la circulation et l'expression des cytokines pro-inflammatoires (146). Les probiotiques ajoutés à la diète ω -6 des donneurs réduisent cet effet du microbiote chez les receveurs. *Bifidobacteria* est connu pour réduire la perméabilité intestinale, évitant l'entrée d'endotoxines comme les LPS dans la circulation sanguine (146). Nous observons d'ailleurs une concordance entre les résultats de la taille d'infarctus et de la résistance intestinale : les receveurs du microbiote ω -6 présentent une baisse significative de la résistance intestinale et une hausse significative de la taille d'infarctus, contrairement aux autres groupes.

D'ailleurs, pour vérifier que le LPS passait effectivement plus à travers la barrière intestinale des rats receveurs du microbiote ω -6 sans probiotiques ajoutés, la concentration plasmatique de LPS a été mesurée et les résultats ont confirmé cette hypothèse. La baisse de la résistance intestinale pour ce même groupe permet un passage plus accru de LPS dans la circulation sanguine. Une fois dans la circulation, les LPS sont associés à une augmentation de l'inflammation (4, 36). Ils sont reconnus par les récepteurs TLR4, très présents au niveau du cœur, et sont impliqués dans l'activation de la voie TLR4/MyD88/NF- κ B (4, 36). Si nous comparons les résultats de l'activation de NF- κ B à ceux de la concentration plasmatique de LPS, nous voyons une correspondance pour les groupes receveurs du microbiote ω -6. En effet, une forte concentration plasmatique de LPS induit une plus forte activation de NF- κ B. Les cytokines pro-inflammatoires exprimées par l'activation de cette voie comprennent IL-1, IL-6, IL-8 et TNF- α (128). IL-8 permet le recrutement de cellules immunitaires, comme les macrophages et les neutrophiles (128). L'activité de MPO permet de déterminer la présence de neutrophiles dans l'endocarde suite à un infarctus (133). L'activité de

la MPO mesurée est réduite significativement lorsqu'il y a présence de probiotiques dans le microbiote des receveurs, mais est augmentée chez les receveurs du microbiote ω -6, ce qui pourrait expliquer, en partie, l'augmentation de la taille d'infarctus pour ce même groupe. En effet, la libération d'enzymes protéolytiques et de ROS par les neutrophiles peuvent infliger des dommages supplémentaires au tissu myocardique.

De plus, la phosphorylation d'Akt a été mesurée pour estimer l'activation de la voie de cardioprotection RISK dans la région endocardique des receveurs après 15 minutes de reperfusion. Les résultats démontrent qu'autant le facteur de la diète que celui de la prise de probiotiques avaient une influence sur l'activation d'Akt, estimée par la phosphorylation de la Thr308 et de la Ser473. Les receveurs de diète ω -3, ainsi que les receveurs de microbiote combiné avec les probiotiques ont une activation de la voie de cardioprotection augmentée. Il est connu que la voie RISK impliquant Akt peut moduler l'ouverture du mPTP et inhiber BAD, tous deux impliqués dans la voie intrinsèque de l'apoptose (140). Une diminution de l'activation d'Akt pour le groupe receveur du microbiote ω -6 permettrait ainsi une augmentation de l'activation de la voie intrinsèque d'apoptose (116). Donc, la plus faible activation de la voie RISK dans l'endocarde des receveurs ω -6 semblerait pouvoir être augmentée avec l'ajout de probiotiques dans la diète des donneurs et pourrait également expliquer la différence de la taille de l'infarctus observée entre les groupes R. ω -6 et les R. ω -6+P.

L'analyse du microbiote a permis d'observer que le ratio de *Firmicutes/Bacteroidetes* était augmenté chez les R. ω -6 en comparaison avec les autres groupes. Dans une étude portant sur le microbiote de souris hypertendus, ce ratio était d'ailleurs augmenté (148). Ce résultat concorde avec les données de pression moyenne obtenue (figure 1A) et permet de constater que la prise de probiotique fait en sorte que le ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* diminue tout comme la pression. La composition du microbiote variant beaucoup selon la diète et la prise de probiotique, nous avons présenté le résultat du séquençage pour

quelques bactéries dont la concentration variait de manière significative et intéressante. En effet, les *Entérobactéries*, faisant partie du phylum des *Proteobacteria* connu pour leur production importante de LPS, étaient présentes en plus grand nombre lorsqu'il n'y avait pas de prise de probiotiques et lorsque le microbiote provenait d'une diète riche en ω -6 (33). La même chose était observée pour les *Clostridium*, bactéries associées dans une étude à une activité pro-inflammatoire via MCP-1(149). Deux autres espèces de bactéries ont attiré notre attention, soit les *Akkermensia* et les *Roseburia*. En effet, toutes les 2, au contraire des *Enterobactéries* et des *Clostridium*, étaient moins exprimées chez nos R. ω -6 que dans les autres groupes. Ceci est intéressant étant donné que toutes les 2 sont considérées comme étant des productrices de SCFA et ayant des effets anti-inflammatoires (50, 147).

Chapitre 7. Conclusion

Nos résultats ont démontré que le microbiote ω -6 est associé à une hausse des bactéries productrices de LPS, une diminution des bactéries productrices de SCFA et à une concentration de LPS plus élevée. Ces endotoxines affectent la perméabilité intestinale et se retrouvent en grande quantité dans la circulation sanguine. Une fois dans la circulation, elles ont des effets pro-inflammatoires, activant la voie NF- κ B, augmentant l'expression des cytokines pro-inflammatoires, attirant des neutrophiles dans le myocarde ischémique atténuant ainsi l'activation des voies de cardioprotection qui entrent en jeu lors d'un infarctus. Ceci résulte en une augmentation de la taille d'infarctus des receveurs de ce microbiote. L'ajout de probiotiques à ce régime permet d'en atténuer les effets néfastes.

Bibliographie

1. Guarner Francisco F. Gut flora in health and disease. Lancet, The. 2003;361(9356):512-9.
2. Eckburg Paul BP. Archaea and their potential role in human disease. Infection and immunity.71(2):591-6.
3. Quigley Eamonn MME. Gut bacteria in health and disease. Gastroenterology hepatology.9(9):560-9.
4. Nicholson JK, Holmes E, Kinross J, Burcelin R, Gibson G, Jia W, et al. Host-gut microbiota metabolic interactions. Science. 2012;336(6086):1262-7.
5. Rodríguez J, Murphy K, Stanton C, Ross RP, Kober O, Juge N, et al. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. Microbial Ecology in Health and Disease. 2015;26:26050-.
6. Eckburg Paul BP. Diversity of the human intestinal microbial flora. Science. 2005;308(5728):1635-8.
7. Moore WEW. Some current concepts in intestinal bacteriology. American Journal of Clinical Nutrition, The. 1978;31(10):33-42.
8. den Besten Gijs G. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. Journal of Lipid Research, The.54(9):2325-40.
9. Suzuki Takuya T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. Cellular and Molecular Life Sciences.70(4):631-59.
10. Young B, O'Dowd G, Woodford P, Wheater PR, Wheater PR. Wheater's functional histology : a text and colour atlas. Sixth edition. ed. Philadelphia: Churchill Livingstone/Elsevier; 2014. x, 452 pages p.
11. Campbell NA. Biologie. 4e éd. ed. Saint-Laurent, Qué.: ERPI; 2012. 1458 p.
12. Zuo Li L. Tight Junctions as Targets and Effectors of Mucosal Immune Homeostasis. Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology. 2020;10(2):327-40.
13. Heyman M, Abed J, Lebreton C, Cerf-Bensussan N. Intestinal permeability in coeliac disease: insight into mechanisms and relevance to pathogenesis. Gut. 2012;61(9):1355.
14. Fanning ASA. Transmembrane proteins in the tight junction barrier. Journal of the American Society of Nephrology.10(6):1337-45.
15. Fujimoto KK. Freeze-fracture replica electron microscopy combined with SDS digestion for cytochemical labeling of integral membrane proteins. Application to the immunogold labeling of intercellular junctional complexes. Journal of Cell Science.108:3443-9.
16. Furuse MM. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. Journal of Cell Biology, The.123(6):1777-88.
17. Mazzon EE. Effect of stress on the paracellular barrier in the rat ileum. Gut.51(4):507-13.

18. Assimakopoulos Stelios FS. Experimental obstructive jaundice disrupts intestinal mucosal barrier by altering occludin expression: beneficial effect of bombesin and neurotensin. *Journal of the American College of Surgeons*.198(5):748-57.
19. Holmes Jennifer LJ. Claudin profiling in the mouse during postnatal intestinal development and along the gastrointestinal tract reveals complex expression patterns. *Gene Expression Patterns*.6(6):581-8.
20. Van Itallie Christina MC. Claudins and epithelial paracellular transport. *Annual Review of Physiology*. 2006;68:403-29.
21. Schulzke Joerg DJ. Epithelial tight junctions in intestinal inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences*.1165:294-300.
22. Martìn-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, et al. Junctional Adhesion Molecule, a Novel Member of the Immunoglobulin Superfamily That Distributes at Intercellular Junctions and Modulates Monocyte Transmigration. *Journal of Cell Biology*. 1998;142(1):117-27.
23. Bazzoni Gianfranco G. The JAM family of junctional adhesion molecules. *Current Opinion in Cell Biology*.15(5):525-30.
24. González-Mariscal LL. Tight junction proteins. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*.81(1):1-44.
25. Itoh MM. Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *Journal of Cell Biology*, The. 1999;147(6):1351-63.
26. Fanning Alan SA. Isolation and functional characterization of the actin binding region in the tight junction protein ZO-1. *FASEB Journal*, The.16(13):1835-7.
27. Suzuki Takuya T. Regulation of the intestinal barrier by nutrients: The role of tight junctions. *Animal Science Journal*.91(1).
28. Tamboli CP, Neut C, Desreumaux P, Colombel JF. Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2004;53(1):1-4.
29. Harris K, Kassis A, Major G, Chou CJ. Is the gut microbiota a new factor contributing to obesity and its metabolic disorders? *J Obes*. 2012;2012:879151.
30. R RM, Marques FZ. Diet-related gut microbial metabolites and sensing in hypertension. *J Hum Hypertens*. 2020.
31. Panya A, Pundith H, Thongyim S, Kaewkod T, Chitov T, Bovonsombut S, et al. Antibiotic-Antiapoptotic Dual Function of Clinacanthus nutans (Burm. f.) Lindau Leaf Extracts against Bovine Mastitis. *Antibiotics (Basel)*. 2020;9(7).
32. Cochet F, Peri F. The Role of Carbohydrates in the Lipopolysaccharide (LPS)/Toll-Like Receptor 4 (TLR4) Signalling. *Int J Mol Sci*. 2017;18(11).
33. Rigottier-Gois L. Dysbiosis in inflammatory bowel diseases: the oxygen hypothesis. *Isme j*. 2013;7(7):1256-61.
34. Lupp C, Robertson ML, Wickham ME, Sekirov I, Champion OL, Gaynor EC, et al. Host-mediated inflammation disrupts the intestinal microbiota and promotes the overgrowth of Enterobacteriaceae. *Cell Host Microbe*. 2007;2(2):119-29.
35. Zhang FX, Kirschning CJ, Mancinelli R, Xu XP, Jin Y, Faure E, et al. Bacterial lipopolysaccharide activates nuclear factor-kappaB through interleukin-1 signaling

- mediators in cultured human dermal endothelial cells and mononuclear phagocytes. *J Biol Chem.* 1999;274(12):7611-4.
36. Boulangé CL, Neves AL, Chilloux J, Nicholson JK, Dumas ME. Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease. *Genome Med.* 2016;8(1):42.
 37. Chen M, Liu Y, Xiong S, Wu M, Li B, Ruan Z, et al. Dietary l-tryptophan alleviated LPS-induced intestinal barrier injury by regulating tight junctions in a Caco-2 cell monolayer model. *Food Funct.* 2019;10(5):2390-8.
 38. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* 2006;444(7121):860-7.
 39. Bennett BJ, de Aguiar Vallim TQ, Wang Z, Shih DM, Meng Y, Gregory J, et al. Trimethylamine-N-oxide, a metabolite associated with atherosclerosis, exhibits complex genetic and dietary regulation. *Cell Metab.* 2013;17(1):49-60.
 40. Zeisel SH, daCosta KA, Youssef M, Hensey S. Conversion of dietary choline to trimethylamine and dimethylamine in rats: dose-response relationship. *J Nutr.* 1989;119(5):800-4.
 41. Randrianarisoa E, Lehn-Stefan A, Wang X, Hoene M, Peter A, Heinzmann SS, et al. Relationship of Serum Trimethylamine N-Oxide (TMAO) Levels with early Atherosclerosis in Humans. *Sci Rep.* 2016;6:26745.
 42. Haghighi A, Li XS, Liman TG, Bledau N, Schmidt D, Zimmermann F, et al. Gut Microbiota-Dependent Trimethylamine N-Oxide Predicts Risk of Cardiovascular Events in Patients With Stroke and Is Related to Proinflammatory Monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018;38(9):2225-35.
 43. Tang WH, Wang Z, Fan Y, Levison B, Hazen JE, Donahue LM, et al. Prognostic value of elevated levels of intestinal microbe-generated metabolite trimethylamine-N-oxide in patients with heart failure: refining the gut hypothesis. *J Am Coll Cardiol.* 2014;64(18):1908-14.
 44. Li X, Shimizu Y, Kimura I. Gut microbial metabolite short-chain fatty acids and obesity. *Biosci Microbiota Food Health.* 2017;36(4):135-40.
 45. Khan MT, Nieuwdorp M, Bäckhed F. Microbial modulation of insulin sensitivity. *Cell Metab.* 2014;20(5):753-60.
 46. Kim M, Friesen L, Park J, Kim HM, Kim CH. Microbial metabolites, short-chain fatty acids, restrain tissue bacterial load, chronic inflammation, and associated cancer in the colon of mice. *Eur J Immunol.* 2018;48(7):1235-47.
 47. Kaye DM, Shihata WA, Jama HA, Tsyganov K, Ziemann M, Kiriazis H, et al. Deficiency of Prebiotic Fiber and Insufficient Signaling Through Gut Metabolite-Sensing Receptors Leads to Cardiovascular Disease. *Circulation.* 2020;141(17):1393-403.
 48. Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, Endo TA, Nakato G, Takahashi D, et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature.* 2013;504(7480):446-50.
 49. Chang PV, Hao L, Offermanns S, Medzhitov R. The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(6):2247-52.

50. Hiippala K, Jouhten H, Ronkainen A, Hartikainen A, Kainulainen V, Jalanka J, et al. The Potential of Gut Commensals in Reinforcing Intestinal Barrier Function and Alleviating Inflammation. *Nutrients*. 2018;10(8).
51. Kelly CJ, Zheng L, Campbell EL, Saeedi B, Scholz CC, Bayless AJ, et al. Crosstalk between Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids and Intestinal Epithelial HIF Augments Tissue Barrier Function. *Cell Host Microbe*. 2015;17(5):662-71.
52. Ohira H, Tsutsui W, Fujioka Y. Are Short Chain Fatty Acids in Gut Microbiota Defensive Players for Inflammation and Atherosclerosis? *J Atheroscler Thromb*. 2017;24(7):660-72.
53. Scheppach W. Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function. *Gut*. 1994;35(1 Suppl):S35-8.
54. Brown AJ, Goldsworthy SM, Barnes AA, Eilert MM, Tcheang L, Daniels D, et al. The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J Biol Chem*. 2003;278(13):11312-9.
55. Tedelind S, Westberg F, Kjerrulf M, Vidal A. Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: a study with relevance to inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2007;13(20):2826-32.
56. Do MH, Lee E, Oh MJ, Kim Y, Park HY. High-Glucose or -Fructose Diet Cause Changes of the Gut Microbiota and Metabolic Disorders in Mice without Body Weight Change. *Nutrients*. 2018;10(6).
57. Mukhopadhyia I, Hansen R, El-Omar EM, Hold GL. IBD-what role do Proteobacteria play? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012;9(4):219-30.
58. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007;56(7):1761-72.
59. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA, et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*. 2011;334(6052):105-8.
60. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*. 2008;57(6):1470-81.
61. Lecomte V, Kaakoush NO, Maloney CA, Raipuria M, Huinao KD, Mitchell HM, et al. Changes in gut microbiota in rats fed a high fat diet correlate with obesity-associated metabolic parameters. *PLoS One*. 2015;10(5):e0126931.
62. Ji Y, Sakata Y, Tso P. Nutrient-induced inflammation in the intestine. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2011;14(4):315-21.
63. Miranda PM, De Palma G, Serkis V, Lu J, Louis-Auguste MP, McCarville JL, et al. High salt diet exacerbates colitis in mice by decreasing *Lactobacillus* levels and butyrate production. *Microbiome*. 2018;6(1):57.
64. Bielinska K, Radkowski M, Grochowska M, Perlejewski K, Huc T, Jaworska K, et al. High salt intake increases plasma trimethylamine N-oxide (TMAO) concentration and produces gut dysbiosis in rats. *Nutrition*. 2018;54:33-9.
65. Simopoulos AP. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother*. 2002;56(8):365-79.

66. Voet D, Voet JG, Voet D, Domenjoud L. Biochimie. 3e édition. ed. Louvain-la-Neuve: De Boeck Supérieur; 2016. 1685 p.
67. Saini RK, Keum Y-S. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance — A review. *Life Sci*. 2018;203:255-67.
68. Desnoyers M, Gilbert K, Madingou N, Gagné M-A, Daneault C, Des Rosiers C, et al. A high omega-3 fatty acid diet rapidly changes the lipid composition of cardiac tissue and results in cardioprotection. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2018;96(9):916-21.
69. Noriega B, Sanchez Gonzalez M, Salyakina D, Coffman J. Understanding the Impact of Omega-3 Rich Diet on the Gut Microbiota. *Case Reports in Medicine*. 2016;2016:3089303-.
70. Moreira AP, Texeira TF, Ferreira AB, Peluzio Mdo C, Alfenas Rde C. Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia. *Br J Nutr*. 2012;108(5):801-9.
71. Gilbert K, Arseneault-Bréard J, Flores Monaco F, Beaudoin A, Bah TM, Tompkins TA, et al. Attenuation of post-myocardial infarction depression in rats by n-3 fatty acids or probiotics starting after the onset of reperfusion. *Br J Nutr*. 2013;109(1):50-6.
72. Rondeau I, Picard S, Bah TM, Roy L, Godbout R, Rousseau G. Effects of different dietary ω -6/3 polyunsaturated fatty acids ratios on infarct size and the limbic system after myocardial infarction. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2011;89(3):169-76.
73. Bhatt DL, Steg PG, Miller M, Brinton EA, Jacobson TA, Jiao L, et al. Reduction in First and Total Ischemic Events With Icosapent Ethyl Across Baseline Triglyceride Tertiles. *J Am Coll Cardiol*. 2019;74(8):1159-61.
74. Kotwal S, Jun M, Sullivan D, Perkovic V, Neal B. Omega 3 Fatty acids and cardiovascular outcomes: systematic review and meta-analysis. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*. 2012;5(6):808-18.
75. Greene JA, Choudhry NK, Kesselheim AS, Brennan TA, Shrank W. Changes in direct-to-consumer pharmaceutical advertising following shifts from prescription-only to over-the-counter status. *Jama*. 2012;308(10):973-5.
76. Costantini L, Molinari R, Farinon B, Merendino N. Impact of Omega-3 Fatty Acids on the Gut Microbiota. *Int J Mol Sci*. 2017;18(12).
77. Hotel A. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria – Joint FAO/WHO Expert Consultation. 2001;2014.
78. Douillard FP, Mora D, Eijlander RT, Wels M, de Vos WM. Comparative genomic analysis of the multispecies probiotic-marketed product VSL#3. *PLoS One*. 2018;13(2):e0192452.
79. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, et al. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014;11(8):506-14.
80. Mennigen R, Nolte K, Rijcken E, Utech M, Loeffler B, Senninger N, et al. Probiotic mixture VSL#3 protects the epithelial barrier by maintaining tight junction protein

- expression and preventing apoptosis in a murine model of colitis. 2009;296(5):G1140-G9.
81. Derrien M, Vaughan EE, Plugge CM, de Vos WM. *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2004;54(Pt 5):1469-76.
 82. Canada Adlspd. Rapport du système canadien de surveillance des maladies chroniques : les maladies du coeur au Canada, 2018. 2018.
 83. Committee on Social Security C, Board on the Health of Select P. Cardiovascular Disability 2010.
 84. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407(6801):233-41.
 85. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Chaitman BR, Bax JJ, Morrow DA, et al. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *Journal of the American College of Cardiology*. 2018;72(18):2231-64.
 86. Romero ME, Fernandez-Jimenez R, Ladich E, Fuster V, Ibanez B, Virmani R. Pathology of Myocardial Infarction and Sudden Death. In: Fuster V, Harrington RA, Narula J, Eapen ZJ, editors. *Hurst's The Heart*, 14e. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2017.
 87. Kessler R, Chiu W, Demler O, Merikangas K, Walters E. Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Archives of General Psychiatry*. 2005;62(6):617-27.
 88. Briffa T, Hickling S, Knuiman M, Hobbs M, Hung J, Sanfilippo FM, et al. Long term survival after evidence based treatment of acute myocardial infarction and revascularisation: follow-up of population based Perth MONICA cohort, 1984-2005. *BMJ (Clinical research ed)*. 2009;338:b36-b.
 89. Hoffman JI. Heterogeneity of myocardial blood flow. *Basic Research in Cardiology*. 1995;90(2):103-11.
 90. Xie L, Wang DI. Energy metabolism and ATP balance in animal cell cultivation using a stoichiometrically based reaction network. *Biotechnology and Bioengineering*. 1996;52(5):591-601.
 91. Voet D, Voet JG, Domenjoud L. *Biochimie: De Boeck*; 2016.
 92. Jennings RB, Murry CE, Steenbergen C, Reimer KA. Development of cell injury in sustained acute ischemia. *Circulation*. 1990;82(3 Suppl):II2-II2.
 93. Martin C, Vallet B, Riou B. *Physiologie humaine appliquée (2e édition)*: Arnette; 2017.
 94. Jennings RB, Reimer KA. The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annu Rev Med*. 1991;42:225-46.
 95. Krebs HA. The history of the tricarboxylic acid cycle. *Perspectives in Biology and Medicine*. 1970;14(1):154-70.
 96. Reimer KA, Jennings RB, Tatum AH. Pathobiology of acute myocardial ischemia: metabolic, functional and ultrastructural studies. *The American Journal of Cardiology*. 1983;52(2):72A-81A.
 97. Kalogeris T, Baines C, Krenz M, Korthuis R. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2012;298:229-317.

98. Jennings RB, Sommers HM, Herdson PB, Kaltenbach JP. Ischemic injury of myocardium. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1969;156(1):61-78.
99. Cerra FB, Lajos TZ, Montes M, Siegel JH. Hemorrhagic infarction: A reperfusion injury following prolonged myocardial ischemic anoxia. *Surgery*. 1975;78(1):95-104.
100. PG C. Ischémie myocardique peropératoire 2008 [updated Avril 2016. Available from: <http://www.precisdanesthesiocardiaque.ch/Chapitre10/Ischemmyocper.html>.
101. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*. 2007;357(11):1121-35.
102. Buja LM. Myocardial ischemia and reperfusion injury. *Cardiovasc Pathol*. 2005;14(4):170-5.
103. Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, Flack HA, Linn H. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol*. 1960;70:68-78.
104. Lieberthal W, Koh JS, Levine JS. Necrosis and apoptosis in acute renal failure. *Semin Nephrol*. 1998;18(5):505-18.
105. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial Reperfusion Injury. 2007;357(11):1121-35.
106. Piper HM, Meuter K, Schäfer C. Cellular mechanisms of ischemia-reperfusion injury. *The Annals of Thoracic Surgery*. 2003;75(2):S644-S8.
107. Monassier JP. Reperfusion injury in acute myocardial infarction. From bench to cath lab. Part I: Basic considerations. *Arch Cardiovasc Dis*. 2008;101(7):491-500.
108. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA, Kuby J. Immunologie : le cours de Janis Kuby : avec questions de révision. Paris: Dunod; 2008. 684 p.
109. Zweier JL. Measurement of superoxide-derived free radicals in the reperfused heart. Evidence for a free radical mechanism of reperfusion injury. *J Biol Chem*. 1988;263(3):1353-7.
110. Khaper N, Kaur K, Li T, Farahmand F, Singal PK. Antioxidant enzyme gene expression in congestive heart failure following myocardial infarction. *Mol Cell Biochem*. 2003;251(1-2):9-15.
111. Menasche P, Piwnica A. Free radicals and myocardial protection: a surgical viewpoint. *Ann Thorac Surg*. 1989;47(6):939-45.
112. Shen AC, Jennings RB. Myocardial calcium and magnesium in acute ischemic injury. *Am J Pathol*. 1972;67(3):417-40.
113. Piper HM, Meuter K, Schafer C. Cellular mechanisms of ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg*. 2003;75(2):S644-8.
114. Monassier JP. Reperfusion injury in acute myocardial infarction. From bench to cath lab. Part I: Basic considerations. *Arch Cardiovasc Dis*. 2008;101(7-8):491-500.
115. Rossello X, Yellon DM. The RISK pathway and beyond. *Basic Res Cardiol*. 2018;113(1):2.
116. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495-516.
117. Teringova E, Tousek P. Apoptosis in ischemic heart disease. *Journal of Translational Medicine*. 2017;15(1):87.
118. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(1):47-59.

119. Rossi D, Gaidano G. Messengers of cell death: apoptotic signaling in health and disease. *Haematologica*. 2003;88(2):212-8.
120. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science*. 1998;281(5381):1305-8.
121. Teringova E, Tousek P. Apoptosis in ischemic heart disease. *J Transl Med*. 2017;15(1):87.
122. Zhao ZQ, Nakamura M, Wang NP, Wilcox JN, Shearer S, Ronson RS, et al. Reperfusion induces myocardial apoptotic cell death. *Cardiovasc Res*. 2000;45(3):651-60.
123. Holly TA, Drincic A, Byun Y, Nakamura S, Harris K, Klocke FJ, et al. Caspase inhibition reduces myocyte cell death induced by myocardial ischemia and reperfusion in vivo. *J Mol Cell Cardiol*. 1999;31(9):1709-15.
124. Yaoita H, Ogawa K, Maehara K, Maruyama Y. Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor. *Circulation*. 1998;97(3):276-81.
125. Brocheriou V, Hagege AA, Oubenaissa A, Lambert M, Mallet VO, Duriez M, et al. Cardiac functional improvement by a human Bcl-2 transgene in a mouse model of ischemia/reperfusion injury. *J Gene Med*. 2000;2(5):326-33.
126. Chen Z, Chua CC, Ho YS, Hamdy RC, Chua BH. Overexpression of Bcl-2 attenuates apoptosis and protects against myocardial I/R injury in transgenic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280(5):H2313-20.
127. Yang Y, Lv J, Jiang S, Ma Z, Wang D, Hu W, et al. The emerging role of Toll-like receptor 4 in myocardial inflammation. *Cell Death Dis*. 2016;7(5):e2234.
128. Sharma HS, Das DK. Role of cytokines in myocardial ischemia and reperfusion. *Mediators Inflamm*. 1997;6(3):175-83.
129. Lu M, Tang F, Zhang J, Luan A, Mei M, Xu C, et al. Astragaloside IV attenuates injury caused by myocardial ischemia/reperfusion in rats via regulation of toll-like receptor 4/nuclear factor- κ B signaling pathway. *Phytother Res*. 2015;29(4):599-606.
130. Cai W, Zhang Y, Li J, Wang J. [κ -opioid receptor agonist U50, 488H attenuates myocardial ischemia-reperfusion via modulating Toll-like receptor 4/nuclear factor- κ B signaling in rat]. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*. 2014;42(10):866-72.
131. Rossen RD, Michael LH, Kagiya A, Savage HE, Hanson G, Reisberg MA, et al. Mechanism of complement activation after coronary artery occlusion: evidence that myocardial ischemia in dogs causes release of constituents of myocardial subcellular origin that complex with human C1q in vivo. *Circ Res*. 1988;62(3):572-84.
132. Diepenhorst GM, van Gulik TM, Hack CE. Complement-mediated ischemia-reperfusion injury: lessons learned from animal and clinical studies. *Ann Surg*. 2009;249(6):889-99.
133. Mullane KM, Kraemer R, Smith B. Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium. *J Pharmacol Methods*. 1985;14(3):157-67.
134. Smith EF, 3rd, Egan JW, Bugelski PJ, Hillegass LM, Hill DE, Griswold DE. Temporal relation between neutrophil accumulation and myocardial reperfusion injury. *Am J Physiol*. 1988;255(5 Pt 2):H1060-8.

135. de Lorgeril M, Basmadjian A, Lavallée M, Clément R, Millette D, Rousseau G, et al. Influence of leukopenia on collateral flow, reperfusion flow, reflow ventricular fibrillation, and infarct size in dogs. *Am Heart J.* 1989;117(3):523-32.
136. Litt MR, Jeremy RW, Weisman HF, Winkelstein JA, Becker LC. Neutrophil depletion limited to reperfusion reduces myocardial infarct size after 90 minutes of ischemia. Evidence for neutrophil-mediated reperfusion injury. *Circulation.* 1989;80(6):1816-27.
137. Barandon L, Couffinhal T, Dufourcq P, Daret D, Allières C, Alzieu P, et al. [Study of postmyocardial infarction scar-formation mechanisms: advantage of an experimental myocardial infarction model in mice]. *The Canadian journal of cardiology.* 2004;20(14):1467-75.
138. Dewald O, Ren G, Duerr GD, Zoerlein M, Klemm C, Gersch C, et al. Of mice and dogs: species-specific differences in the inflammatory response following myocardial infarction. *Am J Pathol.* 2004;164(2):665-77.
139. Lecour S. Activation of the protective Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) pathway against reperfusion injury: Does it go beyond the RISK pathway? *J Mol Cell Cardiol.* 2009;47(1):32-40.
140. Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. 2005;9(1):59-71.
141. Davidson SM, Hausenloy D, Duchon MR, Yellon DM. Signalling via the reperfusion injury signalling kinase (RISK) pathway links closure of the mitochondrial permeability transition pore to cardioprotection. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2006;38(3):414-9.
142. Kelly JR, Borre Y, C OB, Patterson E, El Aidy S, Deane J, et al. Transferring the blues: Depression-associated gut microbiota induces neurobehavioural changes in the rat. *J Psychiatr Res.* 2016;82:109-18.
143. Adnan S, Nelson JW, Ajami NJ, Venna VR, Petrosino JF, Jr RMB, et al. Alterations in the gut microbiota can elicit hypertension in rats. 2017;49(2):96-104.
144. Bautista LE, Vera LM, Arenas IA, Gamarra G. Independent association between inflammatory markers (C-reactive protein, interleukin-6, and TNF- α) and essential hypertension. *J Hum Hypertens.* 2005;19(2):149-54.
145. Kaliannan K, Wang B, Li X-Y, Kim K-J, Kang JX. A host-microbiome interaction mediates the opposing effects of omega-6 and omega-3 fatty acids on metabolic endotoxemia. *Sci Rep.* 2015;5:11276-.
146. Moreira APB, Texeira TFS, Ferreira AB, do Carmo Gouveia Peluzio M, de Cássia Gonçalves Alfenas R. Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia. *Br J Nutr.* 2012;108(5):801-9.
147. Machiels K, Joossens M, Sabino J, De Preter V, Arijs I, Eeckhaut V, et al. A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut.* 2014;63(8):1275-83.
148. Santisteban MM, Qi Y, Zubcevic J, Kim S, Yang T, Shenoy V, et al. Hypertension-Linked Pathophysiological Alterations in the Gut. *Circ Res.* 2017;120(2):312-23.

149. Shintouo CM, Mets T, Beckwee D, Bautmans I, Ghogomu SM, Souopgui J, et al. Is inflammageing influenced by the microbiota in the aged gut? A systematic review. *Exp Gerontol.* 2020:111079.